

Aus der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Das Sekretom mesenchymaler Stromazellen schützt glatte  
Gefäßmuskelzellen vor Kalzifizierung, was durch Modulation des  
mTOR-Netzwerkes optimiert werden kann**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Clemens Kurth-Stavenhagen, geb. Kurth

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.03.2021

<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>1 EINFÜHRUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Prävalenz und Bedeutung von kardiovaskulären Erkrankungen.....	12
1.1.2 Die Risikofaktoren Diabetes und chronische Niereninsuffizienz .....	12
1.1.3 Formen der Gefäßverkalkung.....	13
1.1.3.1 Kalzifizierende Atherosklerose .....	14
1.1.3.2 Mediasklerose: Kalzifizierung der Gefäßmedia .....	14
<b>1.2 Mediasklerose auf molekularer und zellulärer Ebene .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Physiologische Inhibition der ektopen Kalzifizierung.....	15
1.2.2 Anhaltende pathologische Stimuli bewirken eine Fehlanpassung der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC).....	16
<b>1.3 Mesenchymale Stromazellen (MSC) .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Eigenschaften von Mesenchymalen Stromazellen .....	17
1.3.2 Mesenchymale Stromazellen in Gefäßen: Physiologie und Pathophysiologie .....	18
1.3.3 Regeneratives Potential von mesenchymalen Stromazellen .....	18
1.3.4 Präkonditionierung von mesenchymalen Stromazellen.....	19
<b>1.4 Das mechanistic target of rapamycin (mTOR)-Netzwerk.....</b>	<b>20</b>
1.4.1 Die zwei Arme des mTOR-Netzwerkes.....	20
1.4.1.1 mTOR-Komplex 1 (mTORC1).....	21
1.4.1.2 mTOR-Komplex 2 (mTORC2).....	22
1.4.2 mTOR in der Entstehung der Mediasklerose .....	24
1.4.3 Beeinflussung des mTOR-Netzwerkes: Glukose, Metformin, Insulin und Rapamycin .....	24
1.4.3.1 Glukose und Entwicklung von Insulinresistenz .....	24
1.4.3.2 Das orale Antidiabetikum Metformin .....	25
1.4.3.3 Insulin .....	25
1.4.3.4 Die Modells substanz Rapamycin .....	26
1.4.4 Funktionen von mTOR in mesenchymalen Stromazellen .....	26

<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Humane Primärzellkultur .....</b>	<b>30</b>
3.1.1	Isolation und Expansion humaner mesenchymaler Stromazellen.....	30
3.1.2	Expansion humaner glatter Gefäßmuskelzellen.....	31
3.1.3	Verwendung von humanen mesenchymalen Stromazellen und glatten Gefäßmuskelzellen in Versuchen	32
3.1.4	Versuche mit Mediumübertragung und Kalzifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen.....	33
3.1.5	In der Zellkultur verwendete Substanzen.....	34
<b>3.2</b>	<b>Nachweis der für mesenchymale Stromazellen geforderten Eigenschaften .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie.....	35
3.2.2	Osteoblastäre Differenzierung .....	36
3.2.3	Adipozytäre Differenzierung .....	37
3.2.4	Chondrozytäre Differenzierung.....	38
<b>3.3</b>	<b>Mykoplasmenachweis .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5</b>	<b>Messung des Calciumgehalts.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6</b>	<b>Herstellung von Zell-Lysaten.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7</b>	<b>Quantifizierung des Proteingehaltes .....</b>	<b>42</b>
<b>3.8</b>	<b>Western-Blotting.....</b>	<b>42</b>
<b>3.9</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>44</b>
<b>3.10</b>	<b>Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.11</b>	<b>Liste der verwendeten Chemikalien.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen (MSC) .....</b>	<b>49</b>
4.1.1	Analyse der Oberflächenmarker .....	49
4.1.2	Osteoblastäre Differenzierbarkeit.....	50
4.1.3	Adipozytäre Differenzierbarkeit .....	51
4.1.4	Chondrozytäre Differenzierbarkeit.....	51

<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss des Sekretoms mesenchymaler Stromazellen (MSC) und unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Medikamentöse Beeinflussung von MSC-Sekretom und VSMC-Kalzifizierung</b>	<b>55</b>
4.4.1	Kurzzeitstimulation von MSC mit Metformin- und Insulin-Konzentrationsreihen	55
4.4.2	Langzeitbehandlung mit Metformin- und Insulin-Dosisreihen	57
4.4.3	Wirkung von Metformin auf MSC-Sekretom und Kalzifizierung der VSMC	58
4.4.4	Wirkung von Insulin auf MSC-Sekretom und Kalzifizierung der VSMC	60
4.4.5	Wirkung von Rapamycin auf MSC-Sekretom und Kalzifizierung der VSMC	61
<b>4.5</b>	<b>Signaltransduktionsanalyse: mTOR-Netzwerk in den mediumkonditionierenden Zellen</b>	<b>62</b>
4.5.1	Vergleich der basalen Aktivität von mTOR in MSC und VSMC	63
4.5.2	mTOR-Netzwerk in mit Metformin präkonditionierten Zellen	63
4.5.3	mTOR-Netzwerk in mit Insulin präkonditionierten Zellen	65
4.5.4	mTOR-Netzwerk in mit Rapamycin präkonditionierten Zellen	67
<b>4.6</b>	<b>Zellschicksalsprogramme in kalzifizierenden VSMC</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>INTERPRETATION UND DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Unveränderte Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) unter 100 mg/dl und 450 mg/dl Glukose</b>	<b>70</b>
<b>5.2</b>	<b>Das Sekretom mesenchymaler Stromazellen (MSC) schützt VSMC vor Kalzifizierung</b>	<b>71</b>
5.2.1	Erklärungsansätze für die Protektion durch das MSC-Sekretom	71
5.2.1.1	Von MSC sezernierte Mediatoren	72
5.2.1.2	Exosomen und microRNA	73
<b>5.3</b>	<b>Verstärkte Protektion durch Metformin und Rapamycin, nicht jedoch durch Insulin</b>	<b>74</b>
5.3.1	Analyse des mTOR-Netzwerks in MSC: Erhöhte Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase geht mit Protektion durch das MSC-Sekretom einher	76
5.3.2	Metformin und Rapamycin schützen durch Aktivierung benefizieller <i>cell fates</i>	78
<b>5.4</b>	<b>Limitationen der Arbeit</b>	<b>79</b>
5.4.1	Limitationen des in vitro-Modells	79
5.4.2	Pharmakologische Beeinflussung: Additive Effekte vs. Sekretom-Modulation	80
5.4.2.1	Metformin: Zusätzliche Protektion durch additive Effekte	81
5.4.2.2	Insulin: Verstärkte VSMC-Seneszenz	82
5.4.2.3	Rapamycin: Protektion durch Modulation des MSC-Sekretoms und additive Effekte	82
5.4.3	Der Problemfall Metformin in der Zellkultur	84



<b>5.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>84</b>
5.5.1	Erweiterungen des Modells.....	84
5.5.2	From Bench to Bedside: Sekretom vs. einzelne Faktoren.....	85
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>98</b>

## Zusammenfassung / Summary

---

**Zusammenfassung:** Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die führende Todesursache weltweit. Insbesondere Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus sind von einer vorzeitigen ausgeprägten Kalzifizierung von Arterien betroffen. Bei der Mediasklerose nehmen glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) durch Transdifferenzierung einen osteochondrozytären Phänotyp mit Produktion kalzifizierender extrazellulärer Matrix an. Mesenchymale Stromazellen (MSC), die u.a. im Gefäßbett als Vorläuferzellen für VSMC an Regenerationsprozessen beteiligt sind, sezernieren zahlreiche Faktoren mit parakriner Wirkung, deren therapeutisches Potenzial aktuell Gegenstand zahlreicher Studien ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob MSC durch parakrine Effekte die osteoblastäre Transdifferenzierung und Kalzifizierung von VSMC in einem in vitro-Modell für die Mediasklerose beeinflussen können. Hierzu wurde die Wirkung von MSC-konditioniertem Medium (MSC-KM) auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) als frühem Marker der osteoblastären Differenzierung nach 7 Tagen und auf die Calciumablagerung nach 14 Tagen in VSMC untersucht, die zur osteoblastären Transdifferenzierung angeregt wurden. Im nächsten Schritt wurden Substanzen, die in das für die Differenzierung von MSC wichtige mTOR-Netzwerk eingreifen, auf ihre das MSC-Sekretom modifizierende Wirkung im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung hin untersucht. Neben dem klassischen mTOR-Inhibitor Rapamycin wurden Metformin und Insulin mit inhibierender bzw. aktivierender Wirkung auf den mTOR-Signalweg verwendet. Außer Lösungsmittelkontrollen wurde von separat kultivierten VSMC konditioniertes Medium (VSMC-KM) als Kontrolle verwendet. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die mTOR-Aktivität in den das Medium konditionierenden Zellen und Marker für Zellschicksalsprogramme in den kalzifizierenden VSMC untersucht.

Die Behandlung von VSMC mit MSC-KM während der osteoblastären Transdifferenzierung reduzierte gegenüber VSMC-KM die ALP-Aktivität signifikant um ca. 25 % und die Calciumablagerungen signifikant um ca. 30 %. Durch Präkonditionierung der Spenderzellen mit Metformin und Rapamycin, nicht jedoch mit Insulin, konnte dieser Effekt signifikant gesteigert werden. Mittels Western-Blotting wurde eine stärkere basale Aktivität von AMPK und mehr an Position Serin-473 phosphoryliertes AKT in MSC verglichen mit VSMC nachgewiesen. Durch die Behandlung mit Rapamycin wurde die AMPK-Aktivität signifikant, mit Metformin in MSC zumindest tendenziell gesteigert. Die Behandlung mit Metformin und Rapamycin verminderte tendenziell die Menge von cleaved caspase 3 als Marker der Apoptose in kalzifizierenden

VSMC. Auf gleiche Weise verminderte Rapamycin die Expression von p16 als Marker für zelluläre Seneszenz.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MSC-KM glatte Gefäßmuskelzellen vor Kalzifizierung schützt. Die Präkonditionierung der MSC mit Rapamycin steigerte diesen protektiven Effekt ebenso wie die Behandlung mit Metformin. Hierbei schien Rapamycin das MSC-Sekretom positiv zu beeinflussen, während Metformin eher direkt in den Kalzifizierungsprozess eingriff. Die Verstärkung der protektiven Effekte des MSC-Sekretoms wurde vermutlich durch eine Aktivierung der AMPK hervorgerufen.

**Summary:** Cardiovascular disease is the leading cause of mortality worldwide. Especially patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease suffer from early vascular calcification. In the development of arteriosclerosis vascular smooth muscle cells (VSMC) transdifferentiate into osteochondrogenic cells and produce extracellular calcifying matrix, hence accelerating the calcification process. Mesenchymal stromal cells (MSC), among others serving as VSMC pregenitor cells in the vascular bed, are well known for their paracrine effects which are currently being studied.

This study was designed to investigate MSC secretome's effect on VSMC transdifferentiation and calcification in an in vitro model for arteriosclerosis. Therefore VSMC calcification was measured by alkaline phosphatase (ALP) activity – a marker for early osteoblast differentiation – after 7 days and calcium deposition after 14 days under treatment with MSC conditioned medium (MSC-CM). Further, MSC were preconditioned with drugs interacting with the mTOR pathway, a crucial signalling network for MSC differentiation. Rapamycin, a classic mTOR inhibitor, and antidiabetic drugs metformin and insulin were used, inhibiting or activating mTOR signaling, respectively. Controls were provided using conditioned media from separately cultured VSMC (VSMC-CM) with or without solvent as appropriate. Western blot analysis was performed to estimate mTOR signaling activity in media conditioning cells and cell fate markers were measured in calcifying VSMC.

MSC-CM reduced ALP activity by 25 % and calcium deposition by 30 % approximately in calcifying VSMC compared to VSMC-CM. Preconditioning with metformin and rapamycin, but not with insulin, further attenuated VSMC calcification significantly. Signaling analysis showed stronger basal activity of AMPK in MSC than in VSMC and stronger 473-phosphorylation of AKT. Treatment with rapamycin significantly enhanced AMPK phosphorylation in MSC, treatment with metformin induced a trend to increased AMPK activation. Apoptosis seemed to be reduced by treatment with metformin and rapamycin, respectively, as seen in a reduction of cleaved caspase 3. Cellular senescence seemed to be alleviated by treatment with rapamycin as seen in a reduction of p16.

This study showed that MSC-CM attenuates VSMC calcification. Preconditioning MSC with metformin or rapamycin enhanced beneficial effects. Whereas metformin seemed to directly protect VSMC from calcification, rapamycin modulated MSC-CM's beneficial effects. MSC secretome seemed to be influenced by AMPK activation.

## Abkürzungsverzeichnis

---

Abkürzung	Erklärung
4EBP1	Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein-1
AKT	Proteinkinase B
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Kinase
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches AMP
CKD	Chronische Niereninsuffizienz (engl. chronic kidney disease)
CM	Chondrozytenmedium
Deptor	DEP-Domain Containing mTOR-Interacting Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. Epidermal Growth Factor)
eGFR	Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (engl. Estimated GFR)
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase-1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESRD	Terminale Niereninsuffizienz (engl. End Stage Renal Disease)
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (engl. Fibroblast Growth Factor)
FKBP12	FK506-Binding Protein of 12 kDa
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GvHD	Graft-versus-Host-Disease

HASF	Hypoxia and AKT Induced Stem Cell Factor
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ISCT	International Society for Cellular Therapy
Ko	Kontrolle, Kontrollmedium
LDL	Low-Density Lipoprotein
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MGP	Matrix-Gla-Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	microRNA
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase (engl. Myosin Light Chain Kinase)
mLST8	Mammalian Lethal with Sec13 Protein 8
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MSC-KM	MSC-konditioniertes Medium
mSin1	Mammalian Stress Activated Protein Kinase Interacting Protein
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mTORC	mTOR-Komplex
NO	Stickstoffmonoxid
OM	Osteoblasten-Induktionsmedium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PKD1	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PRAS40	Proline-Rich AKT Substrate 40 kDa
Protor1/2	Protein Observed with Rictor-1/2
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa $\beta$ Ligand
Raptor	Regulatory-Associated Protein of mTOR
Rictor	Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR

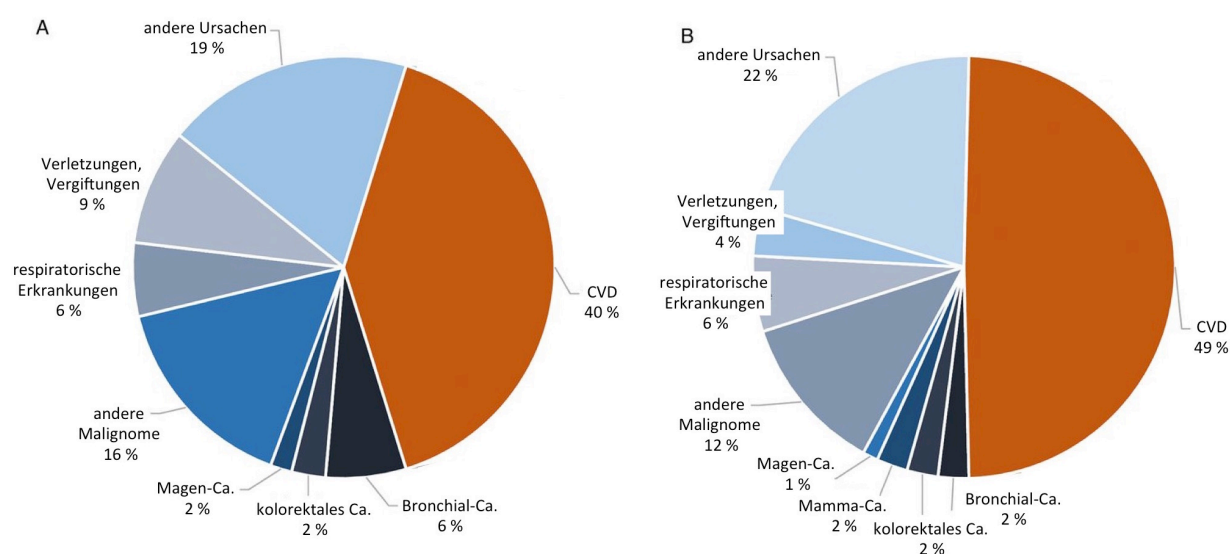
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
S6K1	p70 ribosomale s6-Kinase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SGK1	Serum- and Glucocorticoid-Induced Protein Kinase 1
SMA	Glattmuskuläres Aktin (engl. Smooth Muscle Actin)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter)
TBS	Tris-gepufferte NaCl-Lösung (engl. Tris-Buffered Saline)
TBS-T	Tris-gepufferte NaCl-Lösung mit Tween20
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen (engl. Vascular Smooth Muscle Cells)
VSMC-KM	VSMC-konditioniertes Medium

## 1 Einführung

### 1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

#### 1.1.1 Prävalenz und Bedeutung von kardiovaskulären Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die weltweit häufigste Todesursache.<sup>1</sup> Unter dem Begriff der kardiovaskulären Erkrankungen werden drei Entitäten zusammengefasst: die koronare Herzkrankheit, Schlaganfälle und die Gruppe anderer vaskulärer Erkrankungen, darunter die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die mesenteriale Ischämie. In Europa sind kardiovaskuläre Erkrankungen jährlich für mehr als 4 Millionen Todesfälle verantwortlich und machen damit 40 % der Todesfälle bei Männern und 50 % bei Frauen aus (Abbildung 1).<sup>2</sup> Davon entfällt die eine Hälfte der Fälle auf die koronare Herzerkrankung, die andere Hälfte auf Schlaganfälle und andere Gefäßerkrankungen.<sup>2</sup>



**Abbildung 1: Mortalität in Europa - die häufigsten Todesursachen bei Männern (A) und Frauen (B)**

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) stellen die mit Abstand häufigste Todesursache in Europa dar. Ca: Karzinom. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach Townsend et al., 2015 <sup>2</sup>

#### 1.1.2 Die Risikofaktoren Diabetes und chronische Niereninsuffizienz

Ein besonders hohes Risiko, an Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu leiden und zu versterben, haben Patienten mit Diabetes mellitus<sup>3,4</sup> und mit chronischer Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease, CKD*).<sup>5</sup>



Eine Metaanalyse von 102 prospektiven Studien kam zu dem Schluss, dass Diabetes mellitus mit einem ungefähr zweifach erhöhten Risiko für alle kardiovaskulären Erkrankungen einhergeht.<sup>6</sup> Das Risiko für vaskuläre Komplikationen bei Typ 1-Diabetikern kann durch eine konsequente Blutzuckereinstellung mittels intensivierter Insulintherapie reduziert werden.<sup>7</sup> Die Vorteile einer solchen Therapie lassen sich auch Jahre nach Beendigung der Intervention noch beobachten.<sup>8</sup> Für Typ 2-Diabetiker sind die Vorteile einer strikten Blutzuckereinstellung weniger eindeutig durch Studien belegt.<sup>9-12</sup> Die *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) untersuchte jüngere Typ 2-Diabetiker ohne vorbestehende kardiovaskuläre Komplikationen und verglich eine initial strenge Blutzuckereinstellung mit einer konventionellen Therapie.<sup>13</sup> Zehn Jahre nach Erstdiagnose und damit fünf Jahre nach Beendigung der Intervention im Rahmen der Studie zeigte sich das Risiko für einen Herzinfarkt in der streng eingestellten Gruppe um 15-33 % vermindert.<sup>13</sup>

Auch Patienten mit CKD leiden unter einem im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhten kardiovaskulären Risiko.<sup>14</sup> Tonelli et al. kamen in einer Metaanalyse zu dem Schluss, dass die kardiovaskuläre Mortalität für Patienten mit CKD um den Faktor 1,4-3,7 erhöht ist.<sup>5</sup> Wie deutlich das Risiko erhöht ist, hängt dabei insbesondere vom CKD-Stadium und dem Alter des Patienten ab.<sup>14</sup> Eine andere Metaanalyse bezifferte das Risikoverhältnis für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zur Normalbevölkerung auf 6,2.<sup>15</sup> Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren können dieses deutlich erhöhte Risiko nicht erklären.<sup>16</sup>

Im Rahmen der diabetischen Nephropathie treffen die beiden beschriebenen Risikofaktoren Diabetes mellitus und CKD zusammen. In der *Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Study* (CACTI) zeigte sich eine reduzierte eGFR als Prädiktor für ein Voranschreiten der koronaren Kalzifizierung bei Diabetikern.<sup>17,18</sup> In einem systematischen Review zeigten Preiss et al., dass eine vorhandene Proteinurie bei Diabetikern das globale und das kardiovaskuläre Mortalitätsrisiko deutlich steigert, nämlich von 6,3 auf 39,9 bzw. von 1,2 auf 18,7 Todesfälle pro 1000 Patientenjahre.<sup>19</sup>

### 1.1.3 Formen der Gefäßverkalkung

---

Pathologisches Korrelat der kardiovaskulären Erkrankungen sind Veränderungen der Gefäße, die mit einer Verkalkung der Gefäßwand einhergehen bzw. einhergehen können. Die Einteilung der Erkrankungen arterieller Gefäße ist nicht unumstritten und wird auch gegenwärtig in der Forschung diskutiert.<sup>20</sup> In der Literatur werden im Allgemeinen zwei Formen der Gefäßveränderung gegenübergestellt, die zu einer Verkalkung führen: die Atherosklerose und

die Mönckeberg-Mediasklerose.<sup>21</sup> Beide können unabhängig voneinander oder überlappend auftreten oder nebeneinander bestehen.

#### 1.1.3.1 Kalzifizierende Atherosklerose

---

Die Atherosklerose ist die klinisch bedeutsamste Form und ihr Pathomechanismus durch intensive Forschung gut verstanden. Die „klassischen“ kardiovaskulären Risikofaktoren Dyslipoproteinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Alter und positive Familienanamnese begünstigen ihre Entstehung. Sie wird als eine entzündliche Erkrankung der Gefäßintima betrachtet.<sup>22</sup> Die Einlagerung von LDL-Cholesterin, endotheliale Dysfunktion sowie die Einwanderung und Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten bewirken und unterhalten eine inflammatorische Reaktion.<sup>22</sup> In der Folge kommt es zu einem Umbau der extrazellulären Matrix und zur Entstehung atherosklerotischer Plaques.<sup>22</sup> Diese Plaques können das Lumen einengen und zu hämodynamisch relevanten Stenosen führen oder durch Ruptur die Ausbildung eines Thrombus und damit einen vollständigen Gefäßverschluss auslösen.<sup>23</sup> Im Verlauf der Erkrankung kommt es häufig zu einer Verkalkung der Plaques. Man spricht dann von kalzifizierender Atherosklerose. Hierbei spielen glatte Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) eine wichtige Rolle.<sup>23</sup> Der Kalzifizierungsprozess ist jedoch bei weitem nicht so gut verstanden wie die Plaques-Entstehung selbst.

#### 1.1.3.2 Mediasklerose: Kalzifizierung der Gefäßmedia

---

Die Mediasklerose wird nach ihrem Erstbeschreiber als Mönckeberg-Mediasklerose bezeichnet. Mönckeberg beschrieb eine ausschließlich die Gefäßmedia betreffende Kalzifizierung als eigenständiges Krankheitsbild.<sup>24</sup> Nach heutigem Verständnis wird das Ausmaß der Mediasklerose histopathologisch in Stadien eingeteilt: von einzelnen intra- und extrazellulär in der Tunica media gelegenen kristallinen Ablagerungen über in andere Gefäßwandschichten reichende konfluierende Ablagerungen bis hin zu Herden ektopter Knochenbildung in der Gefäßwand.<sup>16</sup>

„Klassische“ kardiovaskuläre Risikofaktoren spielen nach derzeitigem Stand der Forschung nicht die dominierende Rolle in der Entstehung der Mediasklerose.<sup>16</sup> Stattdessen fällt eine starke Assoziation mit Diabetes mellitus<sup>25</sup> und chronischer Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD), insbesondere mit terminaler CKD (*end stage renal disease*, ESRD)<sup>26,27</sup> auf. Sowohl Diabetes mellitus als auch CKD befördern die Kalzifizierung im Gefäßsystem. Beide Patientengruppen leiden häufiger an kalzifizierender Atherosklerose und an Mediasklerose.<sup>28,29</sup> Das Ausmaß der Mediasklerose sowie die in der Folge verminderte Elastizität der Arterien

stellen gute Prädiktoren der kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit CKD und Diabetes mellitus dar.<sup>15,30,31</sup> Anders als bei der Atherosklerose sind die Mechanismen, die zur Mediasklerose führen, jedoch bislang nur unzureichend verstanden.<sup>32</sup>

## 1.2 Mediasklerose auf molekularer und zellulärer Ebene

---

Das histopathologische Korrelat der Mediasklerose sind kristalline Ablagerungen in der Gefäßmedia bis hin zu Foci ektopter Knochenbildung. Über lange Zeit wurde die Entstehung der Mediasklerose als passiver Prozess betrachtet. Es ist inzwischen jedoch allgemein anerkannt, dass es sich um einen zellulär vermittelten Prozess handelt, in dem glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) eine zentrale Stellung einnehmen.<sup>33</sup>

### 1.2.1 Physiologische Inhibition der ektopten Kalzifizierung

---

Die Bildung von Hydroxylapatit außerhalb von Knochengewebe und damit die ektope Kalzifizierung wird unter physiologischen Bedingungen durch systemisch und lokal wirkende Mechanismen verhindert.

Zur Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase und zum Schutz vor Calciumüberladung sezernieren VSMC Matrixvesikel, die Calcium und Hydroxylapatit, ein Calcium-Phosphat-Salz, enthalten.<sup>34</sup> Inhibitoren der Kalzifizierung verhindern dabei die ektope Kalzifizierung. Die wichtigsten Inhibitoren der Kalzifizierung sind Fetuin A, das Matrix-Gla-Protein (MGP) und Pyrophosphat.<sup>35</sup>

Fetuin A ist ein von der Leber synthetisiertes Protein, das Calcium und Phosphat bindet und dadurch ektope Kalzifizierung verhindert.<sup>36</sup> Zusätzlich zu seiner systemischen Wirkung wird Fetuin A von VSMC aufgenommen und in die calciumhaltigen Matrixvesikel abgegeben. Es verhindert so lokal die ektope Kalzifizierung in Gefäßen.<sup>37</sup> Auch MGP verhindert die Kalzifizierung in den calciumhaltigen Matrixvesikeln der VSMC.<sup>38</sup> MGP kann einerseits Calcium binden und andererseits den pro-kalzifizierend wirkenden Faktor *bone morphogenic protein 2* (BMP2) inaktivieren.<sup>38</sup> Pyrophosphat hingegen inhibiert die Kalzifizierung, indem es an wachsende Hydroxylapatit-Kristalle bindet und die Anlagerung weiterer Phosphationen verhindert.<sup>39,40</sup> Pyrophosphat wird lokal durch die *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1* (ENPP1) gebildet und durch Alkalische Phosphatasen (ALP) abgebaut.<sup>40</sup>

Wie Dai et al. zeigten, verfügen VSMC mit der zellulären Autophagie, also dem kontrollierten Abbau zelleigener Strukturen, über einen weiteren Schutzmechanismus vor Kalzifizierung.<sup>41,42</sup> Im Modell führte die Inhibition der Autophagie zu einer gesteigerten Freisetzung von Matrixvesikeln und verstärkter Kalzifizierung.<sup>42</sup>

### 1.2.2 Anhaltende pathologische Stimuli bewirken eine Fehlanpassung der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)

---

Anhaltende pathologische Stimuli und Milieuveränderungen bringen die oben beschriebenen Mechanismen aus dem Gleichgewicht und führen zu einer Dedifferenzierung oder osteochondrozytären Transdifferenzierung von VSMC.<sup>43</sup> Im Laufe dieses Prozesses verändern VSMC ihren Phänotyp und befördern die Kalzifizierung aktiv.<sup>33</sup>

Sowohl bei Diabetes mellitus als auch bei chronischer Niereninsuffizienz (CKD) sind VSMC vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt.<sup>44-46</sup> In der Folge kommt es zu DNA- und Protein-Schäden und zu einer Störung der Zellfunktion. Bei andauerndem oxidativen Stress verlieren VSMC die Fähigkeit, lokale Inhibitoren der Kalzifizierung zu synthetisieren.<sup>43</sup> Oxidativer Stress kann Funktionsstörungen des endoplasmatischen Retikulums (ER) triggern und sogenannten ER-Stress auslösen, der wiederum die VSMC-Kalzifizierung fördert.<sup>47</sup> Ein dysregulierter Calcium-Phosphat-Haushalt mit Hyperphosphatämie und phasenweiser Hypercalcämie, wie bei vielen Patienten mit CKD zu beobachten, bedeutet zusätzlichen zellulären Stress für VSMC.<sup>48</sup>

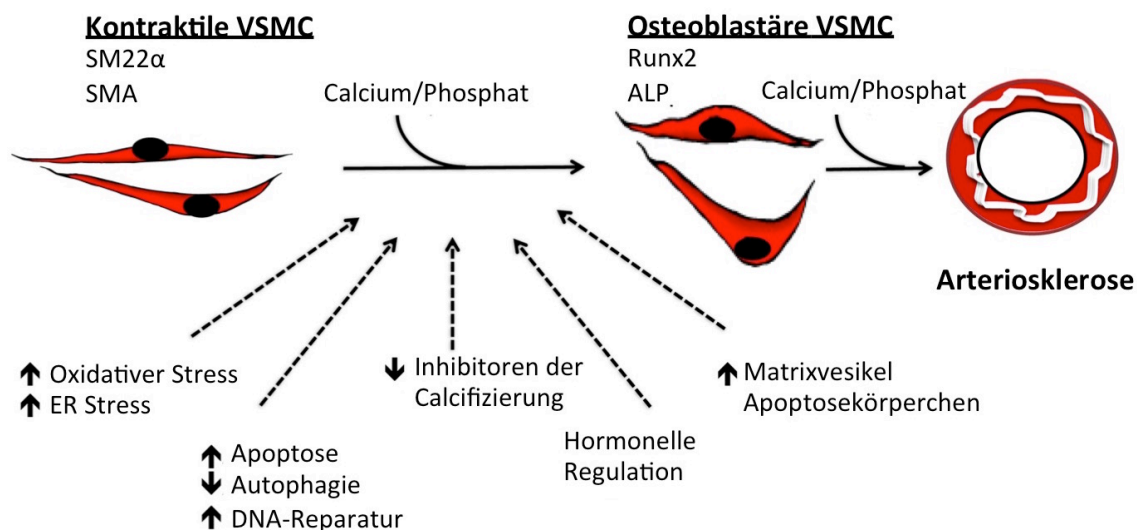
In kalzifizierten Gefäßen konnte gezeigt werden, dass VSMC bestimmte Marker exprimieren, die unter physiologischen Umständen nur in Knochen- und Knorpelzellen beobachtet werden.<sup>49</sup> Dazu zählen die frühzeitige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Runx2, Msx2, Sox9 und Osterix.<sup>49,50</sup> Runx2 reguliert gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren die Osteogenese, indem die Expression von knorpel- und knochenspezifischen Proteinen hochreguliert wird, darunter Osteocalcin und der *receptor activator of nuclear factor-kappa β ligand* (RANKL).<sup>51</sup> Ein spezifischer Runx2-Knockout in VSMC konnte die Kalzifizierung atherosklerotischer Plaques im Mausmodell reduzieren.<sup>51</sup> Oxidativer Stress, aber auch hohe Phosphatspiegel bewirken eine Aktivierung von Runx2 und leiten damit die osteochondrozytäre Transdifferenzierung der VSMC ein.<sup>52,53</sup>

Ist die osteoblastäre Transdifferenzierung eingeleitet, befördern VSMC die ektopische Kalzifizierung aktiv. Der downstream von Runx2 gelegene Transkriptionsfaktor Osterix ist für die Expression des *bone sialoprotein* und der alkalischen Phosphatase (ALP) verantwortlich.<sup>49</sup> Bereits in frühen Stadien der Mediasklerose kann eine Hochregulierung der ALP in VSMC beobachtet werden.<sup>39</sup> Der verstärkte Abbau von Pyrophosphat durch ALP beschleunigt die Kalzifizierung.<sup>40</sup>

Kalzifizierende VSMC sezernieren als Reaktion auf eine Dysregulation des Calcium-Phosphat-Haushaltes und hohe intrazelluläre Calciumspiegel vermehrt calciumhaltige Matrixvesikel.<sup>38,54</sup> Hohe Calcium-Spiegel führen zu einer Verminderung von MGP in den

Matrixvesikeln.<sup>38</sup> Im pathologischen Milieu fungieren die calciumhaltigen Vesikel als Nidus für die Kalzifizierung, da die Kapazität der Kalzifizierungsinhibitoren überstiegen wird.<sup>38,55</sup> Die sezernierten Vesikel enthalten zudem zahlreiche Proteine, darunter Transglutaminase 2 und Matrix-Metalloproteinase 2, die beide die extrazelluläre Matrix regulieren und den Umbau der Gefäßarchitektur fördern.<sup>38</sup>

Der vermehrte zelluläre Stress, aber auch ein gestörter Calcium-Phosphat-Haushalt kann durch Calciumüberladung zur Apoptose von VSMC führen.<sup>56,57</sup> Die in diesem Rahmen freigesetzten Apoptosekörperchen können ähnliche Effekte wie Matrixvesikel ausüben und als Nidus der Kalzifizierung dienen.<sup>56,58</sup>



**Abbildung 2: Mechanismen der Entstehung der Mediasklerose bzw. Arteriosklerose**

Die osteoblastäre Transdifferenzierung kontraktile VSMC (SM22α und SMA (*smooth muscle actin*) als Markerproteine) ist zentrales Element dieses Prozesses. Sie ist eine Anpassungsreaktion auf diverse pathologische Stimuli. ALP: Alkalische Phosphatase, ER: endoplasmatisches Retikulum. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach Leopold, 2015<sup>47</sup>

## 1.3 Mesenchymale Stromazellen (MSC)

### 1.3.1 Eigenschaften von Mesenchymalen Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind mesenchymale Vorläuferzellen, die mit dem Potential zur Selbsterneuerung und der multipotenten Differenzierbarkeit bestimmte Stammzeleigenschaften aufweisen.<sup>59</sup> MSC können aus diversen Geweben isoliert werden, darunter Knochenmark, Nabelschnurblut und Fettgewebe.<sup>60,61</sup> Die Definitionskriterien für MSC waren lange Zeit umstritten.<sup>61</sup> In einem Positionspapier der *International Society for Cellular*

*Therapy* (ISCT) wurden 2006 einheitliche Anforderungen an MSC gestellt: Erstens müssen MSC danach in Kultur plastikadhärent wachsen; zweitens müssen sie die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 exprimieren und gleichzeitig negativ für die Hämatopoese-, Lymphozyten und Monozytenmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD97a oder CD19 sowie für HLA-DR sein; drittens müssen MSC in vitro in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren können.<sup>62</sup>

Von einigen Autoren werden MSC auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet. Werden MSC jedoch entsprechend den ISCT-Richtlinien isoliert, erhält man eine nicht-klonale Kultur von mesenchymalen Stromazellen, darunter lediglich ein variabler Anteil tatsächlicher, multipotenter Stammzellen.<sup>63</sup> In der vorliegenden Arbeit soll daher der Begriff „Mesenchymale Stromazellen“ verwendet werden.

### 1.3.2 Mesenchymale Stromazellen in Gefäßen: Physiologie und Pathophysiologie

---

MSC sind auch in arteriellen Gefäßen zu finden.<sup>64</sup> Bianco et al. stellen die Hypothese auf, dass MSC während der Angiogenese rekrutiert werden, sich im Gefäßbett ansiedeln und im Folgenden perizytäre Funktionen übernehmen.<sup>61</sup> Im Bedarfsfall können sie zu Proliferation und Differenzierung aktiviert werden und zur Gewebeerneuerung oder Gewebeheilung beitragen.<sup>61</sup>

MSC spielen jedoch auch im pathologischen Prozess der Mediasklerose eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen in arteriosklerotischen Läsionen zu finden sind.<sup>65</sup> Ferner besitzt eine Subpopulation der kalzifizierenden Zellen wesentliche Eigenschaften von mesenchymalen Stromazellen.<sup>66</sup>

### 1.3.3 Regeneratives Potential von mesenchymalen Stromazellen

---

Zahlreiche derzeit laufende klinische Studien untersuchen das regenerative Potential von MSC.<sup>67</sup> Aufgrund der fehlenden Expression von MHC II-Molekülen, Fas-Liganden und anderen Korezeptoren nehmen MSC eine immunprivilegierte Stellung ein und sind prinzipiell für die allogene Transplantation geeignet.<sup>59</sup> Drei wesentliche Eigenschaften kennzeichnen das regenerative Potential der MSC: ihre Fähigkeit zur Immunmodulation, ihre multipotente Differenzierbarkeit sowie die Fähigkeit zur Sekretion parakrin wirksamer Mediatoren.<sup>67</sup>

Das immunmodulatorische und –suppressive Potential der MSC ist weithin anerkannt.<sup>68</sup> Über welche Mechanismen MSC jedoch das Immunsystem beeinflussen, ist nicht abschließend geklärt. MSC nehmen sowohl durch direkte Zell-Zell-Interaktion als auch über lösliche Faktoren Einfluss auf die Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.<sup>69</sup> In präklinischen

und klinischen Studien wurden MSC insbesondere mit Erfolg als mögliche Therapie der Graft-versus-Host-Disease (GvHD) nach allogener Stammzelltransplantation untersucht.<sup>68,70,71</sup>

MSC können nicht nur *in vitro* und auch *in vivo* in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren.<sup>67</sup> Kawada et al. zeigten in einer Studie am Mausmodell mit akutem Myokardinfarkt, dass MSC gezielt geschädigtes Myokard aufsuchen und in Kardiomyozyten differenzieren können.<sup>72</sup> In einer klinischen Studie aus dem Jahr 2004 erhielten Patienten mit akutem Myokardinfarkt im Rahmen der Koronarangiographie intrakoronar MSC.<sup>73</sup> Nach 3 bis 6 Monaten zeigten die derart behandelten Patienten eine bessere linksventrikuläre Funktion als die Kontrollgruppe.<sup>73</sup> In der POSEIDON-Studie erhielten Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie transendokardial MSC.<sup>74</sup> Die derart behandelten Patienten hatten im Verlauf eine kleinere Infarktnarbe und eine bessere linksventrikuläre Funktion.<sup>74</sup>

Lee et al. zeigten am Mausmodell, dass sich nur jeweils weniger als 1.000 von insgesamt über 1.000.000 MSC nach intravenöser Applikation in sechs Organen außerhalb der Lungenstrombahn befanden.<sup>75</sup> Der Großteil der transplantierten MSC verbleibt nach intravenöser Infusion in Gebieten der Mikrozirkulation, insbesondere in der Lungenstrombahn.<sup>76,77</sup> Sogar nach intrakoronarer Applikation von MSC im Schweinmodell konnten nach 2 Wochen nur noch 2 % der infundierten MSC im Myokard nachgewiesen werden.<sup>78</sup> Dies lässt vermuten, dass MSC nicht allein durch die Differenzierung in Kardiomyozyten die Geweberegeneration fördern.<sup>76,78</sup>

Die von MSC sezernierten Faktoren scheinen einen wesentlichen Beitrag zum regenerativen Potential der MSC zu leisten. *In vitro* Untersuchungen identifizierten Wachstumsfaktoren, Immunmodulatoren und Modulatoren der extrazellulären Matrix als Bestandteile des MSC-Sekretoms – als solches wird die Gesamtheit der von MSC sezernierten Faktoren bezeichnet.<sup>63</sup> Gnecci et al. konnten einen protektiven Effekt von MSC-konditioniertem Medium (MSC-KM) auf Kardiomyozyten unter hypoxischen Bedingungen nachweisen.<sup>79</sup> Sie zeigten zudem, dass MSC-KM auch *in vivo* protektiv auf ischämisches Myokard wirkt.<sup>79</sup> Timmers et al. untersuchten die Wirkung von MSC-KM nach Myokardinfarkt im Schweinmodell.<sup>80</sup> Auch sie stellten eine protektive Wirkung fest, die sich drei Wochen nach Myokardinfarkt in einer kleineren Infarktnarbe und einer besseren linksventrikulären Funktion zeigte.<sup>80</sup>

#### 1.3.4 Präkonditionierung von mesenchymalen Stromazellen

Unterschiedliche Ansätze werden verfolgt, um mittels Präkonditionierung das Überleben der MSC nach Transplantation zu verlängern oder aber die Sekretion von protektiven Faktoren zu fördern.<sup>76</sup> Zu den untersuchten Strategien zählen die Präkonditionierung von MSC unter



hypoxischen Bedingungen, durch Serumentzug in vitro, durch Stimulation mit Zytokinen, durch genetische Veränderungen und durch Pharmaka.<sup>76</sup>

Gnecchi et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression der Proteinkinase B (PKB bzw. AKT) die positiven Effekte der MSC bei Myokardischämie verstärkt.<sup>79</sup> Bartunek et al. präkonditionierten MSC mittels Wachstumsfaktoren und untersuchten die Wirkung der Zellen nach endomyokardialer Applikation bei ischämischer Herzerkrankung. Im Schweinemodell konnte eine Verbesserung der Herzfunktion durch die Behandlung mit präkonditionierten MSC erreicht werden.<sup>81</sup>

## 1.4 Das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Netzwerk

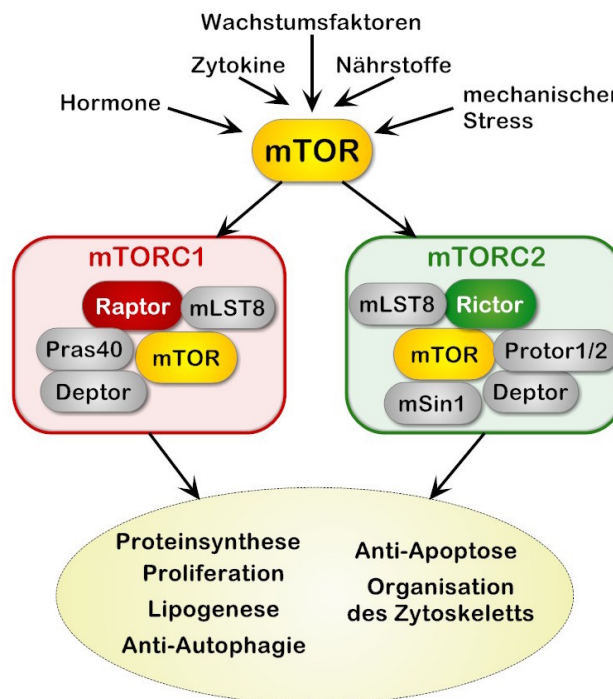
---

### 1.4.1 Die zwei Arme des mTOR-Netzwerkes

---

Das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Netzwerk ist eines der zentralen intrazellulären Netzwerke zur Signalverarbeitung. Durch die Integration von Wachstumsfaktor-vermittelter Signaltransduktion und metabolischen Signalen ist es vor allem an der Regulierung wichtiger Prozesse wie der Proteinsynthese und der Zellschicksale beteiligt (Abbildung 4).<sup>82</sup> Das namensgebende mTOR-Protein (*mechanistic target of rapamycin*) ist eine ubiquitär exprimierte Serin-Threonin-Kinase, die gemeinsam mit anderen Proteinen zwei sich in ihrer Zusammensetzung und ihrer Funktion unterscheidende Komplexe bildet: mTOR-Komplex 1 (mTORC1) und mTOR-Komplex 2 (mTORC2).<sup>82</sup>





**Abbildung 3: Das mTOR-Netzwerk im Überblick und die Zusammensetzung der mTOR-Komplexe**

Das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)-Netzwerk integriert metabolische und zahlreiche andere intra- und extrazelluläre Signale. Mehrere Proteine assoziieren mit mTOR und bilden die mTOR-Komplexe (mTORC) 1 und 2, die sich in Zusammensetzung und regulatorischer Funktion unterscheiden. Raptor: *regulatory-associated protein of mTOR*, PRAS40: *proline-rich AKT substrate 40 kDa*, Depton: *DEP-domain containing mTOR-interacting protein*, mLST8: *mammalian lethal with Sec13 protein 8*, Rictor: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*, Protor1/2: *protein observed with Rictor-1/2*, mSin1: *mammalian stress activated protein kinase interacting protein*. Abbildung erstellt nach Zoncu et al., 2011<sup>94</sup>

#### 1.4.1.1 mTOR-Komplex 1 (mTORC1)

mTORC1 besteht neben mTOR als katalytischer Einheit aus 4 weiteren Proteinen: *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor), *proline-rich AKT substrate 40 kDa* (PRAS40), *DEP-domain containing mTOR-interacting protein* (Depton) und *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8).<sup>82</sup> Die Proteine des mTORC1 erfüllen unterschiedliche Funktionen, Raptor z.B. organisiert den Aufbau von mTORC1.<sup>82</sup>

mTORC1 integriert die durch extrazelluläre Stimuli vermittelte Signaltransduktion einerseits und den intrazellulären metabolischen Status andererseits.<sup>83</sup> In Abhängigkeit des intrazellulären Vorhandenseins von Glukose und Adenosintriphosphat (ATP), Aminosäuren und Sauerstoff reguliert mTORC1 die Zellantwort auf externe Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine, indem es für Zellwachstum und Zellteilung essentielle Prozesse reguliert.<sup>83</sup>

Beispielhaft für die Wirkung extrazellulärer Signale führt Insulin über eine Aktivierung der Proteinkinase B (PKB bzw. AKT) zu einer Aktivierung von mTORC1: Insulin bindet zunächst an den membranständigen Insulinrezeptor, in der Folge wird unter anderem die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase) aktiviert, die die Bildung des Second Messengers Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) katalysiert.<sup>84</sup> Dadurch wird AKT an die Zellmembran rekrutiert und kann durch die *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) an der Position Thr308 phosphoryliert und teilweise aktiviert werden.<sup>84</sup> Für die vollständige Aktivierung muss AKT zusätzlich von mTORC2 an der Position Ser473 phosphoryliert werden.<sup>84</sup> AKT phosphoryliert nun das upstream von mTORC1 gelegene Protein Tuberin (*tuberous sclerosis complex 2*, TSC2), wodurch die inhibierende Wirkung des TSC-Komplexes auf mTORC1 entfällt und mTORC1 aktiviert wird.<sup>84</sup> Außerdem phosphoryliert AKT das Protein PRAS40, das regulatorischer Bestandteil von mTORC1 ist, und verstärkt so die mTORC1-Aktivierung.<sup>85</sup>

Der Energiestatus als Beispiel für intrazelluläre metabolische Signale spiegelt sich in der Ratio von Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosinmonophosphat (AMP) wieder.<sup>86</sup> Im Falle niedriger ATP-Level bewirkt die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) durch Phosphorylierung und Aktivierung von TSC2 sowie durch direkte Phosphorylierung von Raptor eine Inhibierung von mTORC1.<sup>86</sup> Intrazelluläre Energieknappheit führt also zu einer Inhibierung von mTORC1.

mTORC1 fördert in der Gesamtheit seiner Funktionen das Zellwachstum und die Zellteilung.<sup>82</sup> Dies wird erreicht, indem die Synthese von Proteinen, Lipiden und Zellorganellen angeregt und andererseits die Autophagie inhibiert werden.<sup>82</sup> Die Proteinbiosynthese wird dabei von mTORC1 über mehrere Mechanismen angeregt, darunter zwei sehr gut erforschte: mTORC1 phosphoryliert und inaktiviert zum einen das Bindungsprotein 4E-BP1 des Translations-Initiationsfaktors 4E, wodurch die Translation befördert wird.<sup>82</sup> Zum anderen wird die p70 ribosomale s6-Kinase (S6K1) phosphoryliert und aktiviert, dadurch die Translation gesteigert und die Synthese ribosomaler Proteine durch die Aktivierung weiterer Proteine, u.a. des ribosomalen Proteins S6, gefördert.<sup>82</sup>

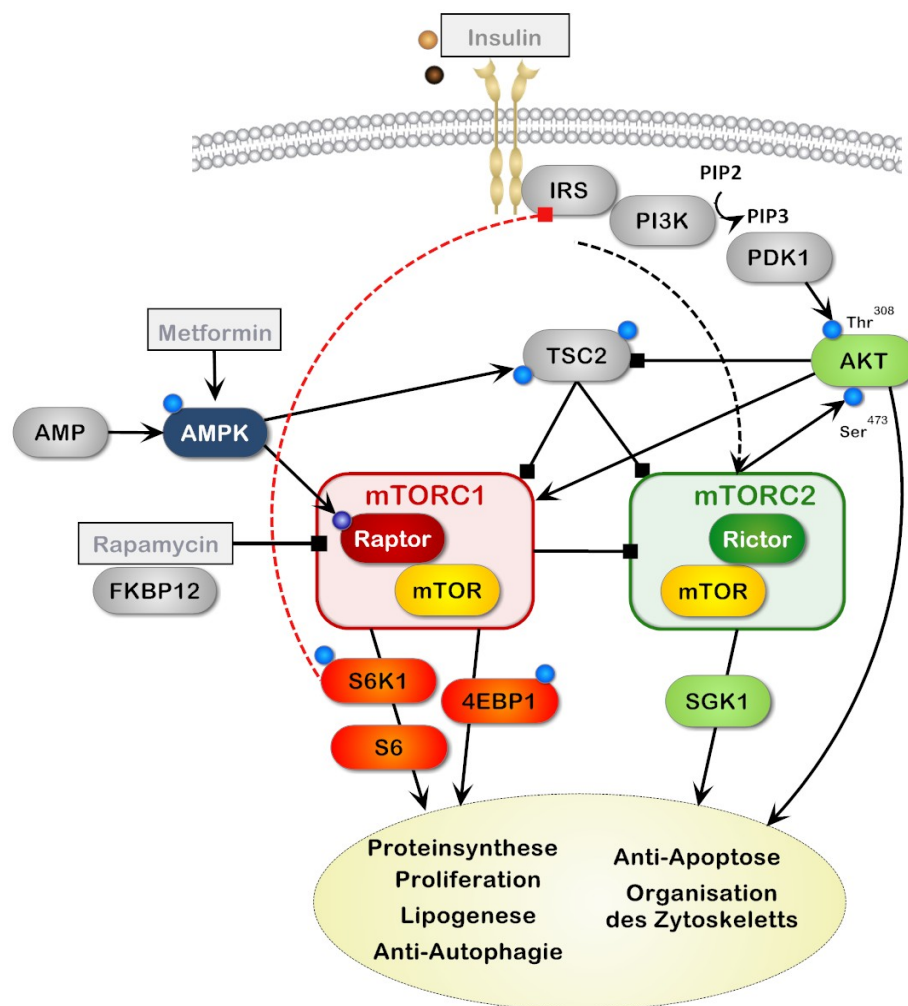
#### 1.4.1.2 mTOR-Komplex 2 (mTORC2)

---

mTORC2 setzt sich aus sechs Proteinen zusammen: mTOR, Deptor und mLST8, die auch an der Bildung von mTORC1 beteiligt sind, außerdem *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor), *protein observed with Rictor-1* (Protor-1) und *mammalian stress activated protein kinase interacting protein* (mSIN1).<sup>82</sup>

mTORC2 ist in seiner Funktionsweise weniger gut verstanden als mTORC1.<sup>82</sup> mTORC2 wird durch Wachstumsfaktoren wie Insulin aktiviert.<sup>87</sup> Über welche Mechanismen die Aktivierung von mTORC2 jedoch genau erfolgt, ist weitgehend unbekannt.<sup>87</sup>

mTORC2 spielt eine zentrale Rolle in der Organisation des Zytoskeletts.<sup>88</sup> Außerdem kontrolliert mTORC2 die Zellteilung, das Zellüberleben und den Metabolismus, indem es wichtige Kinasen aktiviert, darunter die *serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1* (SGK1) und AKT.<sup>82</sup> Im Gegensatz zu SGK1 ist AKT nicht gänzlich von mTORC2 abhängig,



**Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung des mTOR-Netzwerkes**

Dargestellt sind zentrale Upstream- und Downstream-Regulationsmechanismen des *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Netzwerkes sowie die Wirkungsweisen von Metformin, Insulin und Rapamycin. 4EBP1: *eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1*, AMP: Adenosinmonophosphat, AKT: Proteinkinase B, AMPK: *AMP-activated kinase*, FKBP12: *FK506 binding protein*, IRS: *insulin receptor substrate*, PDK1: *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*, PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*, Raptor: *regulatory-associated protein of mTOR*, Rictor: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*, S6: *ribosomal protein s6*, S6K1: *S6 kinase 1*, SGK1: *serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1*, TSC: *tuberous sclerosis complex*. Abbildung erstellt nach Zoncu et al., 2011<sup>94</sup>

muss jedoch zur vollständigen Aktivierung von mTORC2 an der Position Ser473 phosphoryliert werden.<sup>89</sup> AKT ist damit nicht nur, wie oben beschrieben, Aktivator von mTORC1, sondern liegt gleichzeitig downstream von mTORC2.<sup>89</sup> Da AKT durch mTORC2 aktiviert wird, steht mTORC2 sowohl upstream von AKT als auch von mTORC1.<sup>89</sup>

#### 1.4.2 mTOR in der Entstehung der Mediasklerose

---

Eine Fehlregulation des mTOR-Netzwerkes ist für die Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen zentral.<sup>90</sup> Auch in der Entstehung der Mediasklerose spielt mTOR eine Rolle. In MSC, potentiellen Vorläufern von VSMC, geht die osteoblastäre Differenzierung mit einer verminderten Aktivität der AMPK, einem Inhibitor von mTORC1, einher.<sup>91</sup> Zhao et al. zeigten kürzlich, dass durch Blockade von mTORC1 die Kalzifizierung von VSMC reduziert werden kann.<sup>92</sup> Heath et al. fanden Hinweise dafür, dass die frühzeitige Mediasklerose bei Diabetes mellitus durch AKT vermittelt wird.<sup>93</sup>

#### 1.4.3 Beeinflussung des mTOR-Netzwerkes: Glukose, Metformin, Insulin und Rapamycin

---

Die Dysregulation und die pharmakologische Beeinflussung des mTOR-Netzwerkes sind von großer klinischer Relevanz. Einige zentrale Aspekte werden im Folgenden erläutert.

##### 1.4.3.1 Glukose und Entwicklung von Insulinresistenz

---

Ein Überangebot an Glukose und anderen Nährstoffen stellt einen wichtigen Aktivator für mTORC1 dar. Bei Überernährung, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 wird eine chronisch erhöhte mTORC1-Aktivität beobachtet.<sup>90</sup> Durch die Aktivierung von mTORC1 wird die Synthese und Speicherung von Lipiden angeregt.<sup>90</sup> Über einen negativen Feedback-Mechanismus trägt die Daueraktivierung von mTORC1 gleichzeitig wesentlich zur Insulinresistenz und damit zur Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 bei.<sup>94</sup> Die durch mTORC1 aktivierte S6K1 phosphoryliert und inaktiviert das Insulinrezeptor-Substrat 1 (IRS1), das wichtigste Mediatorprotein zur Auslösung der Effektorkaskaden.<sup>94</sup> Durch die in der Folge verminderte AKT-Aktivierung werden die intrazelluläre Insulinwirkung abgeschwächt, weniger Glukose in die Zelle aufgenommen und die hepatische Glukoneogenese verstärkt.<sup>94</sup>

Obwohl der aktivierende Einfluss des Insulin-Signalweges abgeschwächt wird, bleibt mTORC1 aufgrund des Überangebotes von Glukose und Aminosäuren aktiviert.<sup>94</sup> Der negative Feedback-Mechanismus wird aufrecht erhalten und bewirkt eine Insulinresistenz der Zellen.

#### 1.4.3.2 Das orale Antidiabetikum Metformin

---

Das Biguanid Metformin ist ein orales Antidiabetikum und wird aufgrund seiner guten Verträglichkeit und des positiven Effektes auf das Körpergewicht insbesondere bei übergewichtigen Typ 2 Diabetikern als Mittel der ersten Wahl angesehen.<sup>95</sup> Der antidiabetische Wirkmechanismus von Metformin war lange Zeit unklar. Heute gilt es als gesichert, dass Metformin die mitochondriale Atmungskette teilweise inhibiert und dadurch zu einer Verschiebung des intrazellulären ATP/AMP-Verhältnisses zugunsten von AMP führt, die Zellen also in einen künstlichen Zustand der Energieknappheit versetzt.<sup>95</sup> Dadurch wird AMPK phosphoryliert und aktiviert und die Bildung des Second Messengers cAMP reduziert.<sup>95</sup> Durch die Phosphorylierung und Aktivierung von TSC2 sowie durch direkte Phosphorylierung von Raptor wirkt AMPK auch auf das mTOR-Netzwerk und inhibiert mTORC1.<sup>86</sup>

Schon 1998 zeigte die UKPD-Studie einen Überlebensvorteil und weniger kardiovaskuläre Ereignisse unter Metformin verglichen mit anderen oralen Antidiabetika und Insulin.<sup>96</sup> In einer systematischen Metaanalyse konnten diese Ergebnisse in jüngerer Zeit bestätigt werden.<sup>97</sup> Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Metformin vor der Entstehung zahlreicher Tumoren schützt.<sup>95</sup>

Die kardiovaskuläre Protektion lässt sich nicht allein durch die antidiabetische Wirkung von Metformin erklären.<sup>98</sup> In einer Studie am nicht-diabetischen Mausmodell verminderte Metformin die Entstehung atherosklerotischer Plaques und die vaskuläre Seneszenz.<sup>99</sup> In vitro konnte eine Verminderung der glattmuskulären Kalzifizierung unter Metformin gezeigt werden, die durch eine AMPK-vermittelte Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und eine in der Folge erhöhte NO-Synthese begründet wurde.<sup>100</sup> Versuche an Osteoblasten zeigten eine verminderte AMPK-Aktivität während der osteoblastären Differenzierung sowie eine Inhibierung der Differenzierung durch Metformin.<sup>91</sup>

#### 1.4.3.3 Insulin

---

Insulin ist ein körpereigenes anabol wirksames Hormon, das von den Betazellen des Pankreas gebildet und sezerniert wird. Bei Patienten mit Diabetes mellitus kommt es zu einem absoluten (Typ 1) oder relativen (Typ 2) Insulinmangel. Dem relativen Insulinmangel liegt eine periphere Insulinresistenz zugrunde. Über den bereits beschriebenen mTORC1-vermittelten negativen Feedback-Mechanismus wird die Insulin-Wirkung bei andauernder mTORC1-Aktivierung abgeschwächt.<sup>94</sup>

Klinische Anwendung finden Insulin und Insulin-Analoga in der Behandlung des Diabetes mellitus. Der Einfluss von Insulin auf Atherosklerose und Mediasklerose ist vielfältig. Einerseits

vermittelt Insulin über AKT eine Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), wodurch die Bildung von NO, eines der wichtigsten kardiovaskulären Schutzfaktoren, angeregt wird.<sup>101</sup> Andererseits konnte in vitro eine pro-kalzifizierende Wirkung von Insulin auf glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) nachgewiesen werden.<sup>102</sup> Insulin führt zu einer verminderten Bildung von Osteoprotegrin, eines Inhibitors der Kalzifizierung, und zur Expression osteoblastärer Marker in VSMC.<sup>103</sup> Die Rolle von Insulin in der Entstehung der Mediasklerose ist jedoch nicht abschließend geklärt.

#### 1.4.3.4 Die Modellschubstanz Rapamycin

---

Das Makrolid Rapamycin wirkt als direkter Inhibitor des mTOR-Netzwerkes.<sup>104</sup> Durch Bindung an das Protein *FK506-binding protein of 12 kDa* (FKBP12) entsteht der FKBP12-Rapamycin-Komplex.<sup>104</sup> Dieser bindet an mTOR und inhibiert mTORC1.<sup>104</sup> mTORC2 wurde zunächst im Gegensatz zu mTORC1 als grundsätzlich Rapamycin-insensitiver Komplex beschrieben.<sup>88</sup> mTORC2 wird nicht unmittelbar durch den FKBP12-Rapamycin-Komplex inhibiert.<sup>88</sup> Dauerbehandlung mit Rapamycin führt jedoch in vielen Zellen auch zu verminderter mTORC2-Aktivität.<sup>105</sup> Dies lässt sich durch blockierte Bildung des mTORC2 erklären.<sup>105</sup>

Klinische Anwendung findet Rapamycin als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin, da Rapamycin die mTOR-vermittelte Interleukin-2-abhängige Aktivierung von B- und T-Zellen inhibiert, dann häufig unter dem Namen Sirolimus.<sup>106</sup> Außerdem wird die antiproliferative Wirkung von Rapamycin-Analoga wie Everolimus für die Therapie von Tumorerkrankungen genutzt und intensiv beforscht.<sup>106</sup> Eine wichtige Nebenwirkung der Therapie mit Rapamycin ist eine gestörte Glukosetoleranz bis hin zur Ausbildung eines Diabetes mellitus.<sup>106</sup> Diese zunächst nicht intuitiv erscheinende Nebenwirkung der mTOR-Inhibitoren – trägt doch die chronische Hyperaktivierung von mTOR zur Entstehung eines Diabetes mellitus bei – scheint dosis- und zeitabhängig aufzutreten und zumindest teilweise durch eine verminderte mTORC2-Aktivität vermittelt zu werden.<sup>106</sup>

Rapamycin beeinflusst auch den Kalzifizierungsprozess. In präklinischen Studien verringerte Rapamycin die Proliferation von Präosteoblasten und die osteoblastäre Differenzierung von MSC<sup>107</sup> sowie von VSMC<sup>92</sup>.

#### 1.4.4 Funktionen von mTOR in mesenchymalen Stromazellen

---

In mesenchymalen Stromazellen (MSC) reguliert mTOR wichtige Differenzierungsprozesse. So zeigten Hegner et al., dass die Differenzierung von MSC in VSCM durch mTOR vermittelt wird.<sup>108</sup> Außerdem erscheint es möglich, dass mTOR an der Regulation der Zusammensetzung

des MSC-Sekretoms beteiligt ist. Zwar ist grundsätzlich nur wenig über die Regulation des MSC-Sekretoms bekannt.<sup>76</sup> Doch die eng mit dem mTOR-Netzwerk assoziierte Kinase AKT ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, einerseits für das Überleben transplanterter MSC, andererseits für die Sekretion parakrin wirksamer Mediatoren.<sup>109</sup> Das Sekretom von AKT-überexprimierenden MSC zeigte in Versuchen gesteigerte protektive Effekte bei ischämischer Kardiomyopathie.<sup>79</sup> Huang et al. beschrieben den AKT-induzierten kardioprotektiven Faktor HASF (*hypoxia and AKT induced stem cell factor*), den AKT-überexprimierende MSC produzieren.<sup>110</sup>



## 2 Zielsetzung

---

Die Mediasklerose ist die Grundlage der hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Diabetes mellitus und chronischer Niereninsuffizienz sowie insbesondere bei Patienten mit diabetischer Nephropathie. Aufgrund anhaltender pathologischer Stimuli kommt es zu einer osteochondrozytären Transdifferenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und konsekutiv zu einer Kalzifizierung der arteriellen Gefäße. Die vorliegende Arbeit verfolgte einen regenerativen Ansatz zur Behandlung der Mediasklerose.

Patientenstudien zeigten, dass eine intensive Blutzuckereinstellung bei Diabetikern das Ausmaß der Mediasklerose und das kardiovaskuläre Risiko reduzieren kann.<sup>7-12</sup> In dieser Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, ob unterschiedliche Glukosekonzentrationen einen Einfluss auf die Kalzifizierung von VSMC ausübten und ob VSMC unter hyperglykämischen Bedingungen stärker als unter physiologischen Glukosekonzentrationen kalzifizierten.

Es gibt zahlreiche vielversprechende Ansätze für die Verwendung von mesenchymalen Stromazellen (MSC) zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.<sup>67,76,111</sup> In dieser Arbeit sollten die parakrinen Effekte der MSC, also das Sekretom der MSC auf mögliche benefizielle Effekte bei der Differenzierung und Kalzifizierung von VSMC untersucht und damit ein neuartiger Ansatz verfolgt werden.

Um die Zusammensetzung des MSC-Sekretoms zu beeinflussen, sollten MSC pharmakologisch präkonditioniert werden. Als gemeinsamer Angriffspunkt der Pharmaka wurde das mTOR-Netzwerk gewählt, eines der zentralen intrazellulären Netzwerke, das zahlreiche metabolische Signale integriert und Zellschicksale sowie die Proteinsynthese reguliert.<sup>90</sup> Zur Präkonditionierung wurden in dieser Arbeit die Antidiabetika Insulin und Metformin sowie die Modellschubstanz Rapamycin verwendet. Es sollte untersucht werden, ob die möglichen Effekte des MSC-Sekretoms durch mTOR-Modulation beeinflusst werden können.

Darüber hinaus sollte die Aktivität des mTOR-Netzwerkes in den Sekretom-bildenden Zellen untersucht werden, um die Frage zu beantworten, ob die Aktivität des mTOR-Netzwerkes und die beobachteten Effekte des MSC-Sekretoms korrelierten. In den kalzifizierenden VSMC sollten Marker für Zellschicksalsprogramme untersucht werden um zu prüfen, ob eventuelle Effekte des MSC-Sekretoms oder der Pharmaka durch bestimmte Zellschicksalsprogramme vermittelt wurden.

Die Untersuchungen für diese Arbeit wurden an einem Zellkulturmodell durchgeführt. Als Modell für die Mediasklerose wurden VSMC mittels eines calcium- und phosphatreichen



Mediums zur osteoblastären Differenzierung angeregt. Auf diese Weise wurde die für die Mediasklerose zentrale pathologische Transdifferenzierung der VSMC initiiert. Der Effekt des MSC-Sekretoms auf die Kalzifizierung der VSMC wurde untersucht, indem MSC-konditioniertes Medium auf kalzifizierende VSMC übertragen wurde.

### 3 Material und Methoden

---

Am Ende dieses Kapitels werden unter 3.10 und 3.11 sämtliche verwendete Chemikalien sowie die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer tabellarisch aufgeführt.

#### 3.1 Humane Primärzellkultur

---

##### 3.1.1 Isolation und Expansion humaner mesenchymaler Stromazellen

---

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich primäre humane, knochenmarkstämmige mesenchymale Stromazellen (MSC) von gesunden Spendern verwendet. Die Spender willigten nach ärztlicher Aufklärung schriftlich in die Probenentnahme ein und erhielten keine finanzielle Vergütung. Die Spender (2 männlich, 1 weiblich) der in dieser Arbeit verwendeten MSC waren zwischen 8 und 42 Jahren alt.

Die verwendeten MSC wurden von der Kooperationspartnerin PD Dr. Claudia Lange (Klinik für Stammzelltransplantation, Onkologisches Zentrum, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) bezogen. Die Isolation der MSC erfolgte durch Gradienten-Zentrifugation des Knochenmarkpunkts mit Ficoll-Paque. Die mononukleäre Zellschicht wurde abgenommen, durch zweimaliges Waschen und Zentrifugieren aufgereinigt und in Kulturschalen ausgesetzt. Nicht plastikadhärent wachsende Zellen wurden nach drei Tagen durch Waschen mit Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (PBS) abgespült.

Für die Expansion der MSC wurde, entsprechend den veröffentlichten Empfehlungen, ein von Tierserum freies und stattdessen humanes Thrombozytenkonzentrat enthaltendes Zellkulturmedium verwendet.<sup>112</sup> Thrombozytenkonserven von den Blutbanken in Berlin und Hamburg wurden am Tag des Verfallsdatums bezogen, zu je mindesten 15 Stück gepoolt, steril in 25 ml aliquotiert und anschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Alle Thrombozytenkonserven waren zuvor auf infektiöse Bestandteile getestet worden und entsprechend frei von Pathogenen. Die Thrombozytenzahl in den Konzentraten lag zwischen 1,2 und 1,9 x 10<sup>9</sup> /ml.

Das Kulturmedium für die Expansion der MSC setzte sich wie folgt zusammen:

MSC-Kulturmedium	Konzentration
αMEM mit Glutamin	1x
Heparin	2 IU/ml

Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l
Thrombozytenkonzentrat	5 %

Zu expandierende MSC wurden in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einer Dichte von ca. 300 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesetzt und alle drei Tage mit 20 ml frischem Medium versorgt. Die Zellen wurden bis zu maximal 60 % Konfluenz wachsen gelassen, um die multipotente Differenzierbarkeit der MSC zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen entweder gesplittet und weiter kultiviert oder geerntet, um tiefgefroren gelagert oder für Versuche ausgesetzt zu werden.

Im subkonfluenten Zustand wurde zunächst das Kulturmedium von den MSC abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen mit Trypsin von den Kulturflaschen gelöst, indem die Enzymlösung in die Flaschen gegeben, durch Schwenken der Flasche gleichmäßig verteilt, wieder abgesaugt und der verbleibende Rest der Flüssigkeit für 3 bis 5 Minuten mit den Zellen inkubiert wurde. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden entweder sofort erneut in Kultur genommen oder zunächst bei 200 RZB (RZB: relative Zentrifugalbeschleunigung) für 5 Minuten zentrifugiert, sodass ein Pellet entstand, mit dem nach Absaugen des Überstandes und nach Resuspension in frischem Medium weitergearbeitet wurde.

Sollten geerntete MSC nicht weiter kultiviert oder sofort für Versuche ausgesetzt werden, so wurden sie in Kryoröhrchen in einer Lösung aus 10 % DMSO und 90 % fetalem Kälberserum (FCS) eingefroren. Die Zellen wurden dafür zunächst auf -80 °C abgekühlt, bevor sie nach 24 Stunden in einen Flüssigstickstofftank überführt und dort bei -196 °C bis zur Verwendung gelagert wurden.

### 3.1.2 Expansion humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die verwendeten humanen koronaren glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) wurden in Passage 3 käuflich bei den Firmen Promocell und Cellsystems (Lifeline Cell Technology) erworben. VSMC wurden analog zu den MSC in einem speziellen Kulturmedium bis maximal Passage 6 expandiert, bevor sie in Versuchen eingesetzt wurden.

Das VSMC-Kulturmedium setzte sich dabei wie folgt zusammen:

VSMC-Kulturmedium	Konzentration
$\alpha$ MEM	0,5x
DMEM	0,5x
L-Glutamin	5 mM
Ascorbinsäure	50 $\mu$ g/ml
FGF-2	5 ng/ml
EGF	5 ng/ml
Insulin	5 $\mu$ g/ml
Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l
Fetales Kälberserum (FCS)	5 %

### 3.1.3 Verwendung von humanen mesenchymalen Stromazellen und glatten Gefäßmuskelzellen in Versuchen

Die in dieser Arbeit verwendeten MSC und VSMC wurden höchstens 6 Passagen lang kultiviert. Des Weiteren wurden die Zellpräparationen mittels PCR-Untersuchung auf Mykoplasmen getestet und nur bei negativem Testergebnis in Versuchen eingesetzt. Die eingesetzten MSC wurden auf die für MSC geforderten Eigenschaften hin geprüft.<sup>62</sup> In verwendeten VSMC wurde die Expression VSMC-typischer Marker mittels Western-Blot überprüft.

Für Versuche wurden die Zellen mit einer Dichte von ca. 13.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in Kulturschalen oder Mehrlochplatten ausgesetzt. Dabei wurde glutaminhaltiges DMEM mit 1 % FCS verwendet.

Wurden MSC oder VSMC verwendet, die zuvor in Kultur gewesen waren, so wurden diese nach dem Zählen und Pelettieren in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und ausgesetzt. Zuvor in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden zügig auf Raumtemperatur gebracht, indem die Zellen eines jeden 1 mL-Kryoröhrchens in ca. 10 ml DMEM suspendiert wurden. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 200 RZB wurden die Zellen pelettiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden in frisches glutaminhaltiges DMEM 1 % FCS aufgenommen und in Kulturschalen oder Mehrlochplatten ausgesetzt. Um ein besseres Anwachsen der Zellen in den ersten 24 h nach dem Auftauen zu gewährleisten, wurde in einigen Fällen DMEM 1 % FCS für MSC initial mit 5 bis 10 % FCS bzw. für VSMC mit 50 % des oben beschriebenen VSMC-Kulturmediums versetzt.

Die ausgesetzten Zellen wurden nach ca. 24 h, aber frühestens wenn sie eine hinreichende Konfluenz zeigten, mit den jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert. Wurden in den Versuchen Medikamente verwendet, wurde immer eine entsprechende Lösungsmittelkontrolle mitgeführt, um auszuschließen, dass eventuelle Effekte vom Lösungsmittel herrührten.

### 3.1.4 Versuche mit Mediumübertragung und Kalzifizierung von glatten Gefäßmuskelzellen

Zur Untersuchung möglicher Effekte des MSC-Sekretoms auf die Kalzifizierung von VSMC-Zielzellen wurde einfaches Kulturmedium von MSC nach 2 bis 3 Tagen der Konditionierung auf kalzifizierende VSMC übertragen. Um den Effekt des MSC-Sekretoms abschätzen zu können, diente einfaches Kulturmedium von separat zur Medium-Konditionierung kultivierten VSMC als Kontrolle.

Die zur Medium-Konditionierung kultivierten MSC und VSMC wurden alle 2-3 Tage mit frischem Kulturmedium (DMEM 1 % FCS) versorgt. Die sekretomhaltigen Überstände wurden in Eppendorfgeläße oder Zentrifugenröhrchen überführt. Um zu verhindern, dass Zellbestandteile auf die VSMC-Zielzellen übertragen wurden, wurde das konditionierte Medium bei Raumtemperatur und 5.700 RZB für 5 Minuten zentrifugiert. Nun wurde das konditionierte Medium im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem Osteoblasten-Induktionsmedium gemischt. Wurden die mediumkonditionierenden Zellen pharmakologisch präkonditioniert, wurde das Osteoblastenmedium mit dem entsprechenden Pharmakon versetzt, sodass die Ausgangskonzentration wieder erreicht wurde. Das nun einfach konzentrierte, sekretomhaltige Osteoblasten-Induktionsmedium wurde auf die VSMC-Zielzellen übertragen. Mediumwechsel bzw. –übertragungen wurden alle 2 bis 3 Tage durchgeführt.

Das Osteoblasten-Induktionsmedium (OM) auf den VSMC-Zielzellen hatte folgende Zusammensetzung:

OM für VSMC	Konzentration
DMEM	1x
L-Glutamin	2 mM
Dexamethason	0,1 µM
β-Glycerophosphat	10 mM
2-Phospho-L-Ascorbinsäure	0,5 mM
Vitamin D3 (Calcitriol)	10 nM
Calciumgluconat 10%	3,9 µl/ml

Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l
FCS	1 %

### 3.1.5 In der Zellkultur verwendete Substanzen

Sämtliche hier tabellarisch aufgeführte Substanzen wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen gelagert und gelöst, gegebenenfalls steril filtriert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Substanz	Konzentration / gelöst in	Bezugsquelle
Rapamycin	20 nM / DMSO	LC Laboratories R5000
Metformin	5 mM / ddH <sub>2</sub> O	
Insulin	100 nM / ddH <sub>2</sub> O	Berlin Chemie AG HI-219
Dexamethason	0,1-1 µM / Ethanol	AppliChem A2153
β-Glycerophosphat	10 mM / ddH <sub>2</sub> O	AppliChem A2253
2-Phospho-L-Ascorbinsäure	0,1-0,5 mM / ddH <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich 49752
Calciumgluconat 10 %	3,9 µl/ml / ddH <sub>2</sub> O	Braun 0042C13
Vitamin D3 (Calcitriol)	10 nM / Ethanol	
HEPES pH 7,3	20 mM / ddH <sub>2</sub> O	
Natriumpyruvat	1 mM / ddH <sub>2</sub> O	AppliChem A4859
TGFβ-1	10 ng/ml / 0,1 % BSA in 20 mM Zitrat pH3	CellSignaling 8915LC
Indomethazin	0,2 mM / Ethanol	Sigma Aldrich I-7378
3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin	0,5 mM / Ethanol	Serva 26445
Insulin	10 µg/ml / ddH <sub>2</sub> O	Berlin Chemie AG HI-219
FGF-2	5 ng/ml / 0,1 % BSA in ddH <sub>2</sub> O	Immunotools 11343623
EGF	10 ng/ml / 0,1% BSA in ddH <sub>2</sub> O	
L-Glutamin	2-5 mM	PAA M11-004
Ascorbinsäure	50 µg/ml / ddH <sub>2</sub> O	
Heparin 25000 IE/5ml		Rotexmedica ETI3L318-15
MEM-Alpha Modification		PAA E15-862
DMEM 1,0 g/l Glucose		PAA E15-005
DMEM 4,5 g/l Glucose		PAA E15-009

Fetales Kälberserum (FCS)	PAA A15-151
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA P11-010
Primocin	Invivogen ant-pm-2
Kollagen G	Biochrom L7213
Trypsin EDTA (1:250) 10x	PAA L11-003
Accutase™	PAA L11-007

### 3.2 Nachweis der für mesenchymale Stromazellen geforderten Eigenschaften

#### 3.2.1 Analyse der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie

Die geforderte Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf den MSC<sup>62</sup> wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Antikörper untersucht (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS). Bei der FACS-Analyse passieren die untersuchten Zellen einen Laserstrahl. Das bei der Passage einer Zelle entstehende Streulicht sowie eventuelle Fluoreszenzsignale werden detektiert und geben Informationen über die jeweilige Zelle. Dabei gibt das Vorwärtstreulicht (*forward scatter*, FSC) Informationen über das Volumen und das Seitwärtstreulicht (*side scatter*, SSC) über die intrazellulären Bestandteile einer Zelle. Durch das Festlegen eines geeigneten Signalbereiches, durch sogenanntes *gating*, wird verhindert, dass tote Zellen oder Zelldebris vermessen werden. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ein Durchflusszytometer der Firma *Becton Dickinson* (FACSCalibur) verwendet.

Zunächst wurden die kultivierten MSC mit PBS gewaschen und durch 3-minütige Behandlung mit Accutase™, einem Enzymgemisch für die schonende Ablösung von Zellen, von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in der Neubauer-Kammer gezählt. Jeweils 50.000 MSC wurden in 50 µl FACS-Puffer aufgenommen und lichtgeschützt für eine Stunde mit 3 µl der entsprechenden Antikörper-Lösung inkubiert. Nun wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl frischem FACS-Puffer aufgenommen und in speziellen FACS-Röhrchen vermessen. Um die unspezifische Bindung der Antikörper auf den MSC abzuschätzen, wurden zur Kontrolle MSC mit Antikörpern derselben Spezies und desselben Isotyps inkubiert und vermessen.

Folgende Antikörper wurden für die Charakterisierung der MSC eingesetzt:

Antikörper	Bezugsquelle
Isotyp IgG2a FITC	BD 553456

anti-human CD45 FITC	BD 555492
anti-human CD45 PE	BD 555493
Isotyp IgG2a, kappa PE	BD 555574
anti-human HLD-DR FITC	BD 555811
anti-human CD14 FITC	BD 557153
anti-human CD14 PE	BD 557154
anti-human CD73 FITC	BD 561254
anti-human CD105 FITC	BD 561443
Isotyp IgG2a, kappa	BD 555573
anti-human CD11b PE	Immunotech 2581
Isotyp IgG1 PE	Immunotech 07796
anti-human CD14 FITC	Milteny 120-000-424
Isotyp IgG2 FITC	Milteny 120-000-125
anti-human CD45 FITC	Milteny 130-080-002
Isotyp IgG1 FITC	Milteny 120-081-002
anti-human CD19 FITC	Milteny 130-091-328
anti-human CD34 FITC	Milteny 130-092-213
anti-human CD90 FITC	Milteny 130-095-403

### 3.2.2 Osteoblastäre Differenzierung

Um MSC in knochenbildende Zellen differenzieren zu lassen, wurden die Zellen, wie in zahlreichen veröffentlichten Protokollen beschrieben, in einem mit Phosphat angereicherten, Vitamin C- und Dexamethason-haltigen Medium über 2-4 Wochen in Standard-6-Lochplatten kultiviert.<sup>113-115</sup> Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 13.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesetzt und alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt. Das verwendete Osteoblasten-Induktionsmedium (OM) hatte folgende Zusammensetzung:

OM	Konzentration
DMEM	1x
L-Glutamin	2 mM
Dexamethason	0,1 µM
β-Glycerophosphat	10 mM



2-Phospho-L-Ascorbinsäure	0,5 mM
Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l

Zeigten die Zellen unter dem Mikroskop Anzeichen fortgeschrittener Verkalkung, so wurde diese mittels Alizarinfärbung nachgewiesen. Dazu wurden zunächst die Überstände abgesaugt, die Zellen zweimal mit Tris-gepufferter NaCl-Lösung (TBS) gewaschen, anschließend über 30 min bei -20 °C mit Methanol fixiert und luftgetrocknet. Nun wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M Borsäurepuffer pH 4,0 für eine Stunde mit 5 %iger Alizarin-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit Borsäurepuffer, destilliertem Wasser und abschließend 95 %igem Ethanol wurden die Zellschalen luftgetrocknet. Das Ergebnis der Färbung wurde mit einer Kamera der Firma Canon (PowerShot A640) fotografisch dokumentiert.

### 3.2.3 Adipozytäre Differenzierung

Für die Differenzierung der MSC in Fettzellen wurde im Einklang mit gängigen Protokollen ein Adipozyten-Induktionsmedium der folgenden Zusammensetzung verwendet<sup>59,115</sup>:

<b>Adipozytenmedium</b>	<b>Konzentration</b>
DMEM	1x
L-Glutamin	2 mM
Dexamethason	1 µM
Indometacin	0,2 mM
3-Isobuthyl-1-methyl-Xanthin	0,5 mM
Insulin	10 µg/ml
Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l

Die Zellen wurden in Standard-6-Lochplatten zu ca. 13.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesetzt, alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt und während des Zeitraums von 4 Wochen nicht gesplittet.

Zeigten die Zellen unter dem Mikroskop Anzeichen der Differenzierung, insbesondere reichlich Vakuolen als Hinweis für die Speicherung von Triglyzeriden und Cholesterinestern, erfolgte die Färbung mit Oil Red O. Dazu wurden zunächst die Überstände abgesaugt, die Zellen

zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 5 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Färbelösung Oil Red O inkubiert. Abschließend wurden die Schalen mehrmals mit Wasser gewaschen und das Ergebnis der Färbung fotografisch dokumentiert.

### 3.2.4 Chondrozytäre Differenzierung

Um MSC in Knorpelzellen differenzieren zu lassen, wurden die Zellen entsprechend veröffentlichten Protokollen mit einem Chondrozyten-Induktionsmedium der folgenden Zusammensetzung behandelt<sup>115</sup>:

Chondrozytenmedium	Konzentration
DMEM	1x
L-Glutamin	2 mM
Natriumpyruvat	1 mM
HEPES pH 7,3	20 mM
2-Phospho-L-Ascorbinsäure	0,1 mM
Dexamethason	0,1 µM
TGFβ-1	10 ng/ml
Penicillin	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l

Es wurden zwei unterschiedliche Ansätze zum Nachweis der chondrozytären Differenzierung verwendet.

Zum einen wurden MSC als Pellet in einem Zentrifugenröhrchen inkubiert (1 Million Zellen in einem 15 ml-Röhrchen). Das Chondrozyten-Induktionsmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach 4 Wochen wurden die Zellen, wie unter 3.6 beschrieben, lysiert und für die Western-Blot-Analyse aufbereitet. Als chondrozytäres Markerprotein wurde Kollagen IIA1 in den Zellen nachgewiesen.

Zum anderen wurden MSC in 3D-Gelen kultiviert. Für die Herstellung dieser Gele wurden sterile 0,7 M Natriumhydroxid-Lösung, 1 M HEPES-Lösung pH 7,3 und 10x DMEM im Verhältnis 1:1:2 gemischt. Der pH wurde zwischen 7,9 und 8,05 eingestellt und das Gemisch im Verhältnis 1:4 mit einer Kollagen G-Lösung versetzt. Anschließend wurden 1 Million MSC mit 2 mL dieser Lösung in 6-Lochplatten ausgesetzt und bis zur Ausgelierung des Gels inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zellhaltigen 3D-Gele mit Chondrozyten-Induktionsmedium

versorgt. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 4-wöchiger Differenzierung wurden die Überstände abgesaugt, die Zellen mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und anschließend mit Alcianblau gefärbt, um saure Polysaccharide als Marker für die Knorpelmatrix nachzuweisen. Das Ergebnis wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS fotografisch dokumentiert.

### 3.3 Mykoplasmennachweis

---

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellpräparationen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet und nur dann in Versuchen eingesetzt, wenn der Nachweis negativ ausfiel. Um die intrazellulär wachsenden Bakterien nachzuweisen, wurden zwei unterschiedliche Detektions-Kits von den Firmen *AppliChem* (PCR Mycoplasma Test Kit A3744) und *Minerva* (Venor GeM Detection Kit 11-1050) verwendet. Beide Systeme weisen Mykoplasmen oder deren Bestandteile in Zellkulturüberständen mittels PCR nach.

Nach mindestens zwei Tagen Kultur wurde der Überstand von den zu untersuchenden Zellen in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Durch kurze Zentrifugation mit 250 RZB wurden eukaryote Zellen pelletiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Gefäß überführt und anschließend für 20 min bei 21.000 RZB zentrifugiert, um eventuell vorhandene Mykoplasmen oder deren Bestandteile zu pellettieren. Das entstandene Pellet wurde in 50 µl Flüssigkeit resuspendiert und für 5 Minuten bei 99 °C inkubiert, um die Bakterien aufzubrechen. Nun wurde entsprechend den Anweisungen der Hersteller die PCR vorbereitet und durchgeführt. Die entstandenen Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet.

Fiel der Mykoplasmennachweis positiv aus, so bestand die Möglichkeit der antibiotischen Behandlung der Zellpräparation mit Primocin. Nach 2-wöchiger antibiotischer Therapie wurde der Mykoplasmentest wiederholt.

### 3.4 Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase

---

Alkalische Phosphatasen (ALP) sind eine Gruppe von Isoenzymen, die im leicht alkalischen Milieu (pH 9 bis 10) Phosphorsäureester spalten. Die Expression von ALP in glatten Gefäßmuskelzellen dient als früher Marker für die osteoblastäre Differenzierung und die Einleitung des Kalzifizierungsprozesses.

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesetzt und die osteoblastäre Differenzierung mit Osteoblastenmedium induziert. Sieben Tage nach Beginn der Inkubation wurde die ALP-Aktivität in den Zellen bestimmt.

Dazu wurden zunächst die Überstände von den Zellen gründlich abgenommen. Nun wurden die Zellen mit 200 µl ALP-Puffer je Loch für 30 Minuten auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde in Eppendorf-Gefäße überführt, für 10 Minuten auf Eis gekühlt und nach 10-minütiger Zentrifugation bei 21.000 RZB und 4 °C zur Messung der Enzymaktivität und des Proteingehaltes verwendet.

Für die Messung der ALP-Aktivität wurden jeweils 50 µl des Überstandes mit 200 µl einer p-Nitrophenylphosphat-Substratlösung in Triplikaten in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Vergleichsstandard diente die Verdünnungsreihe einer kommerziell erworbenen Alkalischen Phosphatase. Über einen Zeitraum von 60 min wurde in bestimmten Abständen die optische Dichte bei 405 nm in einem Mikroplatten-Photometer der Firma Thermo Scientific (Multiskan Ascent 354) gemessen. Zwischen den Messzeitpunkten wurden die Proben bei 37 °C inkubiert.

Nach Bestimmung des Proteingehalts der Proben (siehe 3.7) konnte über die Differenz zwischen den einzelnen Messwerten und mit Hilfe der Standardreihe die ALP-Aktivität bezogen auf die Proteinkonzentration errechnet und grafisch ausgewertet werden.

### 3.5 Messung des Calciumgehalts

---

Für die Messung des Calciumgehaltes wurden glatte Gefäßmuskelzellen in 12-Loch-Platten ausgesetzt und über 2 bis 3 Wochen mit Osteoblasteninduktionsmedium behandelt. Die intra- und extrazellulären Calciumablagerungen, v.a. in Form von Hydroxylapatit, wurden dann mit der ortho-Cresolphthalein-Komplexon-Methode nachgewiesen. Dabei bildet Cresolphthalein mit Calcium violette Komplexe. AMP schafft das nötige alkalische Milieu und 8-Hydroxy-Quinolin verhindert die Beeinflussung der Messung durch Magnesium.

Sämtliche verwendete Glas- oder Plastikgefäße wurden für die Messung des Calciumgehaltes zuvor gründlich mit verdünnter Salzsäure-Lösung ausgewaschen, um eventuelle Calciumrückstände zu beseitigen.

Befanden sich die glatten Gefäßmuskelzellen nach 2- bis 3-wöchiger Behandlung in einem Zustand fortgeschrittener Verkalkung, so wurden die Überstände gründlich abgesaugt und die Platten mit 200 µl 0,6 M HCl pro Loch für 12 Stunden schüttelnd bei 4 °C inkubiert, sodass die Calciumablagerungen gelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt, die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und für 20 min bei 21.000 RZB zentrifugiert.

In einer 96-Loch-Platte wurde in Duplikaten jeweils 10 µl der Calcium-Standardlösungen als Eichreihe (Konzentrationen von 0 bis 25 mg/dl) sowie 10 µl des Überstandes aufgetragen. In jedes Loch wurden anschließend 150 µl der AMP-Pufferlösung und 150 µl des Cresolphthalein-Reagenz pipettiert. Nun wurde die optische Dichte bei 540 nm im Mikroplatten-Photometer

(Multiskan Ascent 354, Thermo Scientific) gemessen. Die Calciumkonzentration konnte mit Hilfe der Standardreihe errechnet werden.

Um den Proteingehalt der Proben bestimmen und die Calciumkonzentration darauf normieren zu können, wurde der verbleibende Überstand samt Pellet in einem ebenso großen Volumen 0,6 M NaOH/0,1 % SDS aufgenommen und anschließend nach der Protein-DC-Methode vermessen.

### 3.6 Herstellung von Zell-Lysaten

---

Für die Western-Blot-Analysen behandelter Zellpräparationen wurden diese nach erfolgter Behandlung lysiert und aufbereitet. Alle Arbeitsschritte wurden dabei auf Eis durchgeführt.

Unmittelbar bevor Zellen lysiert werden sollten, wurde ein Aliquot des Lyse-Puffers mit den folgenden Inhibitoren versetzt, um die unkontrollierte Aktivität von Enzymen, insbesondere von Phosphatasen und Proteasen, zu unterbinden: Natriumorthovanadat 1 mM, Natriumfluorid 5 mM,  $\beta$ -Glycerophosphat 10 mM, Natriumpyruvat 1 mM sowie der kommerziell erworbene *Complete Protease Inhibitor Cocktail* in einfacher Konzentration. Nachdem der Überstand von den zu analysierenden Zellkulturplatten gründlich abgesaugt worden war, wurden die Zellen mit einem bestimmten Volumen des Lyse-Puffers benetzt: 25  $\mu$ l pro Loch einer 12-Loch-Platte oder 60  $\mu$ l pro Loch einer 6-Loch-Platte. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber abgekratzt, die Suspension in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt, gründlich durchmischt und für 20 Minuten bei 21.000 RZB zentrifugiert.

Wegen des geringen Volumens wurde bei Lysaten aus 12-Loch-Platten auf die Messung des Proteingehalts verzichtet. Stattdessen wurden nach der Zentrifugation 20  $\mu$ l des Überstandes mit 5  $\mu$ l eines 5-fach konzentrierten Laemmli-Puffers versetzt und für 5 Minuten bei 99 °C unter Schütteln aufgeköcht. Das fertige Lysat wurde entweder sofort für die Analyse aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

Bei Zelllysaten aus 6-Loch-Platten und ausreichend großen Volumina der Proben wurde nach der Zentrifugation im Überstand zunächst eine Proteinbestimmung nach der Protein-DC-Methode durchgeführt. Unterschiedliche Proteingehalte wurden durch Zugabe von Lysepuffer ausgeglichen und so auf eine gewünschte Protein-Konzentration normiert. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben mit einem entsprechenden Volumen des 5-fach konzentrierten Laemmli-Puffers versetzt und aufgeköcht, verwendet oder bei -20 °C eingefroren.

### 3.7 Quantifizierung des Proteingehaltes

Proteinkonzentrationen wurden mit einem kommerziell erworbenen Kit der Firma *Biorad* (DCTM Protein Assay, Biorad 500-0113/4/5) bestimmt, das sich die von Lowry et al. entwickelte Nachweismethode zunutze macht.<sup>116</sup> Bei dieser Reaktion bilden zunächst Cu(II)-Ionen Komplexe mit Peptidbindungen, anschließend wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert, welches wiederum das eingesetzte gelbliche Folin-Reagenz reduziert. Die Lösung verfärbt sich blau. Durch Messung der optischen Dichte im Bereich des Absorptionsmaximums zwischen 405 nm und 750 nm kann der Proteingehalt quantifiziert werden.

Für jeden verwendeten Lysepuffer wurde für Konzentrationen von 0 bis 2,5 mg Protein /ml eine Eichreihe mit BSA in dem gleichen Puffer hergestellt, die entsprechend der zu vermessenden Proben als Standard eingesetzt wurden.

5 µl jeder Eichreihen-Konzentration und jeder Probe wurden in Duplikaten auf 96-Loch-Platten aufgetragen. Anschließend wurden 25 µl einer 1:50-Mischung aus den Kit-Reagenzien A und S in jedes Loch pipettiert und im nächsten Schritt mit jeweils 200 µl des Reagenz B vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation auf dem Schüttler wurde die optische Dichte bei 680 nm im Mikroplatten-Photometer (Multiskan Ascent 354, Thermo Scientific) gemessen. Nach Subtraktion des Hintergrundes und Berechnung der Mittelwerte konnte anhand der Eichkurve die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe errechnet werden.

### 3.8 Western-Blotting

Proteinexpression und die mTOR-Netzwerkaktivität in den Zellen wurden mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurden nach Auftrennung der Proteine und Übertragung auf eine Membran mittels spezifischer Antikörper bestimmte Proteine sowie deren Phosphorylierungsgrad als Hinweis auf ihre Aktivierung detektiert und quantitativ ausgewertet.

Die Proteingemische in den hergestellten Zell-Lysaten wurden zunächst, basierend auf der Methode nach Laemmli<sup>117</sup>, mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Für die Blots in dieser Arbeit wurden dabei ein MOPS-Puffer-System und 12 %ige Polyacrylamid-Gele der folgenden Zusammensetzung eingesetzt:

Substanz	Sammelgel	Trenngel
	5 %	12 %
H <sub>2</sub> O	1,0 ml	2,3 ml
AA-Mix 30 %	350 µl	3,3 ml

3,5x Gelpuffer	600 µl	2,3 ml
APS 10 %	30 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl
Volumen	2 ml	8 ml

In der Regel wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 80 Volt begonnen und nach 30 min mit 120 Volt fortgeführt. Während des Vorgangs wurden die Kammern mit Eis gekühlt.

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch vom Gel auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF-Membranen) übertragen. Je nach verwendeter Blotkammer wurde mit Spannungen zwischen 50 und 100 Volt sowie entsprechend angepassten Zeitdauern gearbeitet und stets auf eine ausreichende Kühlung der Kammern geachtet.

Um freie Proteinbindungsstellen auf den Membranen zu blockieren, wurde im Anschluss an das Blotten, aber auch nach jedem Stripping-Vorgang je nach zu verwendendem Primärantikörper für mindestens eine Stunde mit 5-10%iger BSA- oder Milchpulver-Lösung (in TBS-T) geblockt. Erst dann wurden die Blots über Nacht mit den jeweiligen Primärantikörpern (gelöst in 5-10 % BSA in TBS-T) und am folgenden Tag nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T für 1-2 Stunden mit den entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert.

Folgende Antikörper wurden für Western-Blot-Analysen eingesetzt:

<b>Antikörper</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>
α-Tubulin	1:6.000	Maus	Sigma Aldrich T9026
Bcl-2	1:500	Maus	sc-492
βAktin	1:5.000	Maus	Sigma Aldrich M789
Calponin	1:10.000	Maus	Sigma Aldrich C2687
cleaved Caspase3	1:500	Kaninchen	CS 9661
GAPDH	1:50.000	Maus	hytest
Kollagen I	1:5.000	Kaninchen	abcam ab34710
Kollagen IIA1	1:500	Maus	sc-52658
LC3B	1:1.000	Kaninchen	novus NB100-2220
MLCK, Myosin light chain kinase	1:500	Maus	Sigma Aldrich M7905
p16 <sup>INK4a</sup>	1:500	Kaninchen	sc-468
phospho AMPK	1:750	Kaninchen	sc-33524

phospho AKT <sup>S473</sup>	1:1.000	Kaninchen	CST 4060S
phospho AKT <sup>T308</sup>	1:1.000	Kaninchen	CST 9275S
phospho S6 <sup>S240/244</sup>	1:1.000	Kaninchen	CST 5364
SM22 $\alpha$	1:10.000	Ziege	abcam ab10135
SMA, smooth muscle actin	1:5.000	Maus	abcam ab7817
Vimentin	1:10.000	Maus	Millipore MAB3400
anti-Kaninchen (HRPO)	1:25.000	Esel	Dianova 711-035-152
anti-Maus (HRPO)	1:25.000	Esel	Dianova 715-035-151
anti-Ziege (HRPO)	1:25.000	Esel	Dianova 705-035-147

Die Banden wurden mithilfe geeigneter Substrate durch die vom gebundenen Sekundärantikörper katalysierte Chemolumineszenzreaktion in einem Entwickler der Firma *Syngene* detektiert.

Sollten auf einem Blot unterschiedliche Proteine detektiert werden und wurde ein Stripping-Schritt notwendig, so wurde der entsprechende Blot für 20-40 min bei 52 °C mit Stripping-Puffer behandelt, um die Primär- und Sekundärantikörper von der Membran zu entfernen. Im Anschluss wurde wie oben beschrieben stets erneut geblockt, bevor der Blot mit einem neuen Primärantikörper inkubiert wurde.

Für die Entwicklung der Western Blots wurden folgende Reagenzien und Geräte verwendet:

Bezeichnung	Hersteller
Pierce ECL WB Substrate	Thermo Scientific 32209
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific 34076
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific 34087
Blotdetektionseinheit	Syngene G-Box XL 1.4

### 3.9 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Primärdaten sind stets zunächst aus den jeweiligen Programmen in Microsoft Excel übertragen worden und wurden auf dem gemeinsamen Server der Arbeitsgruppe gespeichert. Western Blots wurden mit dem Programm GeneTools der Firma Syngene quantifiziert.

Zur statistischen Auswertung wurden die Daten in GraphPad Prism übertragen. Gepaarte Daten wurden mittels abhängigem t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Zur Prüfung



mehrerer Gruppen gegeneinander wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (engl. two-way ANOVA oder two-way analysis of variance) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt.

### 3.10 Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Substanz	eingesetzte Konzentration
Alizarin-Färbelösung	Alizarin Red-S	5 %
	Borsäure	0,1 M
	pH 4,0 mit HCl	
AMP-Puffer	2-Amino-2-methyl-1-propanol	15,12 %
	pH 10,7 mit HCl	
ALP-Puffer	Tris pH 10	150 mM
	ZnCl <sub>2</sub>	0,1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,1 mM
	TritonX-100	1 %
Alcian-Färbelösung	Alcian Blue 8GX	1 %
	Essigsäure	3 %
	pH 2,5 mit Essigsäure	
APS 10 %	Ammoniumperoxodisulfat	10 %
Borsäurepuffer	Borsäure	0,1 M
	pH 4,0 mit HCl	
Calcium-Farbreagenz	o-Cresolphthalein-Komplex	157 µM
	8-Hydroxyquinolin	6,75 mM
	HCl	6 %
Chromatin-Lysepuffer	Tris pH 7,5	20 mM
	NaCl	350 mM
	TritonX-100	1 %
FACS-Puffer	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 mM
	EDTA	0,5 mM
	FCS oder BSA	2-5 %

	pH 7,3	
Gelpuffer 3,5x	Bis-Tris	1,25 M
	pH 6,5-6,8 mit HCl	
Laemmli-Puffer 5x	Tris-HCl	250 mM, pH 7,5
	DTT	500 mM
	Glycerol	30 %
	SDS	5 %
	Bromphenolblau	0,25 %
Laufpuffer MOPS	MOPS	50 mM
	Tris	50 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
	SDS	0,1 %
	pH 7,7	
Oil-Red-O-Stocklösung	Oil-Red-O (w/v)	0,5 %
	Isopropanol	100 %
Oil-Red-O-Färbelösung	Oil-Red-O-Stocklösung	40 %
	destilliertes Wasser	60 %
	Filtern (0,45 µm Filter)	
PBS, <i>phosphate-buffered saline</i>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3 mM
	pH 7,3	
TBS, <i>Tris-buffered saline</i>	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,6-8,0	
TBS-T	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween20	0,1 %
	pH 7,6-8,0	
Transfer-Puffer MOPS	BICIN	25 mM
	Bis-Tris	25 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM

	Ethanol	10 %
Stripping-Puffer	Glycin	25 mM
	SDS	3,5 mM
	pH 2,0 mit HCl	

### 3.11 Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
2-Amino-2-methyl-1-propanol	AppliChem A0838
2-Propanol, Isopropanol	Carl Roth CP41.4
8-Hydroxy-Quinolin	Sigma Aldrich 22019
Aceton	Carl Roth 9372.1
Acrylamid 30 % (Rotiphorese®)	Carl Roth 3029.1
Albumin Fraktion V, BSA	Carl Roth 8076.2
Alcian Blue 8GX	Sigma Aldrich A3157
Alizarin Red S	Applichem A2306
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich A9164
BICIN	Carl Roth 9162.3
Bis-Tris	AppliChem A1025
Borsäure	Carl Roth 5935
Bromphenolblau	Sigma Aldrich B6131
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem A1101
Essigsäure	Carl Roth 7332.1
Ethanol (absolut)	Carl Roth 9065.1
Ethanol (vergällt, MEK)	Herbeta Arzneimittel
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth 8040.2
Glycerin	Carl Roth 3783.2
β-Glycerophosphat	AppliChem A2253
Glycin	Serva 23390
Kaliumchlorid	Merck 104.936
Kaliumhydroxid	Merck 105.033
Magermilchpulver	AppliChem A0830
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich M9272

---

Methanol	Carl Roth 4627.2
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem A1076
Natriumazid	Sigma Aldrich 71290
Natriumchlorid	Carl Roth 3957.1
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth CN30.2
Natriumfluorid	Fluka 71518
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich 6771.1
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich 450243
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich 56422
Nitrophenyl-Phosphat	Fluka 71768
o-Cresolphthalein Complexone	Fluka 64000
Oil-Red-O	Sigma Aldrich O0625
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich 158127
Salzsäure 37 %	Carl Roth 9277.1
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich 87689
Tris	Carl Roth 4855.3
Tween20	AppliChem A1007
Zinkchlorid	AppliChem 6285

---

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen (MSC)

---

Die Internationale Forschungsgesellschaft für Zelltherapie schlug 2006 in einem Positionspapier Definitionskriterien für mesenchymale Stromazellen (MSC) vor.<sup>62</sup> Danach müssen MSC erstens Plastikadhärenz zeigen. Sie müssen zweitens ein bestimmtes Oberflächenmarkerprofil aufweisen und drittens *in vitro* in Knochen-, Knorpel- und Fettzellen differenzieren können.

Bevor MSC für diese Arbeit in Versuchen eingesetzt wurden, wurden die Zellpopulationen in unterschiedlichen Passagen auf diese Kriterien hin überprüft. Das Merkmal Plastikadhärenz war dabei bereits durch die Isolationsmethode bewiesen.

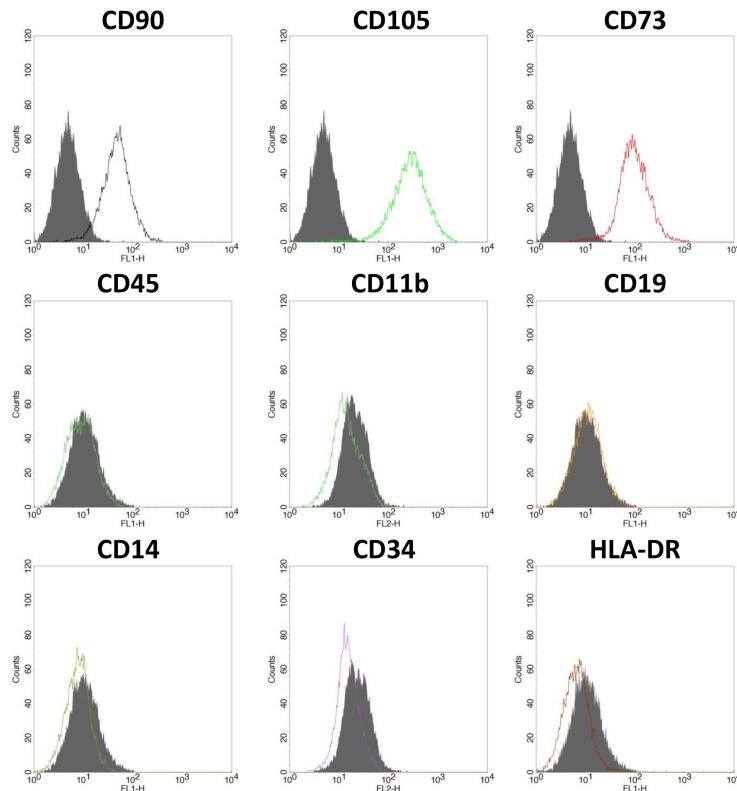
#### 4.1.1 Analyse der Oberflächenmarker

---

Entsprechend den internationalen Kriterien für MSC wurde in allen Zellpräparationen in mehreren Passagen überprüft, ob mindestens 95 % der Zellen die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 exprimierten und gleichzeitig weniger als 5 % der Zellen die für hämatopoetische Zellen typischen Antigene CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR aufwiesen<sup>62</sup>.

Dazu wurden unstimulierte MSC mit spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch vermessen. Für jeden Antikörper wurde eine Isotypen-Kontrolle mitgeführt.

Die Abbildung 5 zeigt repräsentative Ergebnisse einer solchen Messung. Die Zellen der untersuchten Population exprimierten, wie gefordert, CD73, CD90 und CD105 und nur weniger als 5 % der Zellen wiesen die sechs untersuchten Hämatopoese-Marker auf.

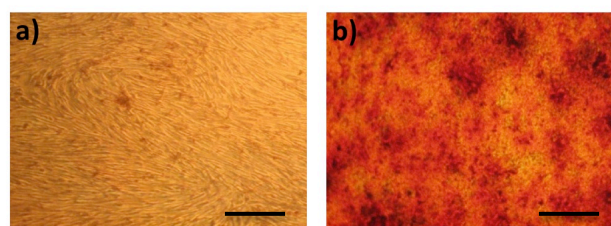


**Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der MSC-Oberflächenmarker**

Repräsentative Untersuchung einer MSC-Population auf die geforderten Oberflächenmarker. Gefüllte Kurven zeigen die Isotypen-Kontrolle an, farbige Linien die gemessenen Signale für die jeweiligen spezifischen Antikörper. Auf der x-Achse ist die Intensität aufgetragen, auf der y-Achse die Zellzahl.

#### 4.1.2 Osteoblastäre Differenzierbarkeit

Um die osteoblastäre Differenzierbarkeit der eingesetzten MSC zu überprüfen, wurden alle Zellpräparationen in unterschiedlichen Passagen, wie unter 3.2.2 beschrieben und in Einklang mit gängigen Protokollen, über drei Wochen mit einem Phosphat-, Vitamin C- und Dexamethason-haltigen Medium behandelt.<sup>113-115</sup> Eine Kontrolle wurde stets mitgeführt und über dieselbe Zeit mit einfachem Kulturmedium ohne Zusätze behandelt. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Zellen fixiert und mit Alizarin gefärbt.



**Abbildung 6: Alizarin-Färbung osteoblastär differenzierter MSC**

Repräsentative Aufnahmen einer MSC-Zellpräparation nach 3-wöchiger Behandlung mit a) Kontrollmedium oder b) Osteoblasten-Induktionsmedium. Alizarin färbt freies Calcium und Calciumverbindungen rot an. Vergrößerung 100x, Balken entspricht 20 µm.

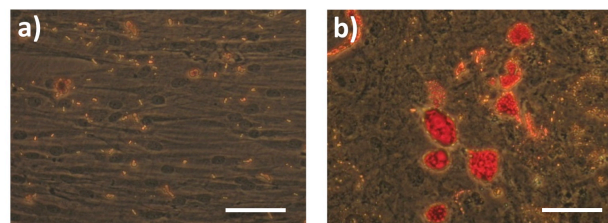
Abbildung 6 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen einer MSC-Präparation nach 3-wöchiger Behandlung. Die Calcium-Ablagerungen stellten sich in der Alizarin-Färbung rot dar. Die Kontrollzellen zeigten weiterhin die typische Spindelform der MSC, während die mit Osteoblastenmedium behandelten Zellen diese Spindelform verloren hatten und die starke Rotfärbung zahlreiche Calciumdepots anzeigte.

#### 4.1.3 Adipozytäre Differenzierbarkeit

---

Alle MSC-Präparationen wurden in unterschiedlichen Passagen auf ihre adipozytäre Differenzierbarkeit hin untersucht. Dazu wurden die Zellen über vier Wochen mit einem Adipozyten-Induktionsmedium behandelt, das entsprechend den gängigen Protokollen Dexamethason, Indometacin, 3-Isobuthyl-1-methyl-Xanthin (IBMX) und Insulin enthielt.<sup>59,115</sup> Als Kontrolle wurden über denselben Behandlungszeitraum MSC mit einfachem Kulturmedium inkubiert. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Zellen fixiert und mit Oil-Red-O gefärbt, um Triglyceride und Cholesterinester nachzuweisen.

Abbildung 7 zeigt repräsentative Aufnahmen einer mit Oil-Red-O gefärbten MSC-Präparation nach 4-wöchiger Behandlung. Zu erkennen waren zahlreiche kräftig rot angefärbte Vakuolen als Korrelat der intrazellulär gespeicherten Fette in den adipozytär differenzierten Zellen. Die mit Kontrollmedium behandelten Zellen zeigten keine Anzeichen der Differenzierung.



**Abbildung 7: Oil-Red-O-Färbung adipozytär differenzierter MSC**

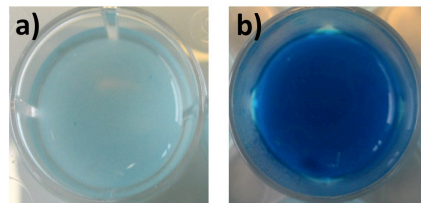
Nach 4-wöchiger Behandlung mit a) Kontrollmedium oder b) Adipozytenmedium wurden die Zellen mit Oil-Red-O gefärbt. Triglyceride und Cholesterinester stellten sich rot dar. b) Zahlreiche intrazelluläre Vakuolen wiesen die adipozytäre Differenzierung nach. Vergrößerung 200x, Balken entspricht 10 µm.

#### 4.1.4 Chondrozytäre Differenzierbarkeit

---

Alle für diese Arbeit verwendeten MSC-Präparationen wurden in unterschiedlichen Passagen auch auf ihre Fähigkeit zur Differenzierung in Chondrozyten untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Chondrozytenmedium behandelt, das TGF- $\beta$  sowie weitere üblicherweise verwendete Zusätze enthielt<sup>115</sup>.

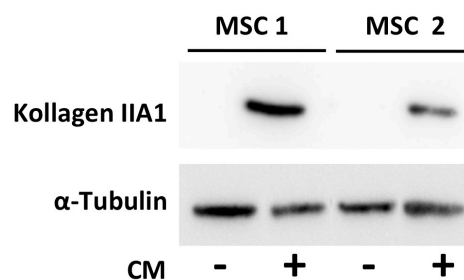
Nach 4-wöchiger Kultur in 3D-Gelen und Behandlung mit Chondrozytenmedium wurden die Zellen fixiert und mit Alcianblau gefärbt, um saure Polysaccharide der Knorpelmatrix nachzuweisen. Abbildung 8 zeigt beispielhaft eine untersuchte MSC-Präparation. Während die mit Kontrollmedium behandelten Zellen sich nicht anfärben ließen, färbte sich das Gel mit den in Chondrozytenmedium kultivierten MSC kräftig blau an, ein deutlicher Hinweis für die chondrozytäre Differenzierung der MSC.



**Abbildung 8: Alcian-Blau-Färbung chondrozytär differenzierter MSC**

Aufnahmen einer MSC-Präparation nach 4-wöchiger Kultur in 3D-Gelen und Behandlung mit a) Kontrollmedium oder b) Chondrozytenmedium. Alcianblau färbt Glykosaminoglykane der Knorpelmatrix blau.

In Pellets kultivierte und mit Chondrozytenmedium behandelte MSC wurden nach 4 Wochen lysiert und mittels Western Blot auf die Expression des knorpelspezifischen Proteins Kollagen IIA1 untersucht. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Ergebnisse für die Untersuchung zweier MSC-Präparationen. Kollagen IIA1 wurde in den mit Chondrozytenmedium (CM +) behandelten Zellen exprimiert, nicht jedoch in den Kontrollzellen.



**Abbildung 9: Western-Blot-Analyse chondrozytär differenzierter MSC**

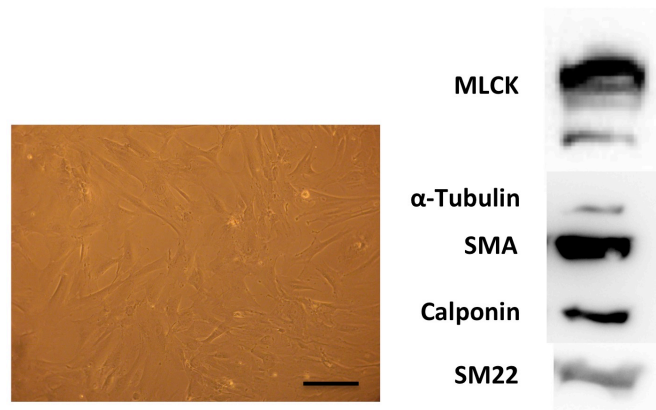
Repräsentative Ergebnisse der Untersuchung zweier MSC-Zellpräparationen. Nach 4-wöchiger Behandlung mit Chondrozytenmedium (CM +) zeigten die MSC im Vergleich zu Kontrollmedium (CM -) deutliche Kollagen IIA1-Expression.  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

## 4.2 Charakterisierung der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Die käuflich erworbenen glatten Gefäßmuskelzellen wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, in Kultur genommen und expandiert. Um sicherzugehen, dass die Zellen auch in höheren Passagen



ihren Phänotyp bewahrten, wurden die VSMC in unterschiedlichen Passagen ohne weitere Behandlung lysiert und mittels Western-Blot-Analyse auf die Expression glattmuskulärer Markerproteine untersucht. Abbildung 10 zeigt beispielhaft für eine Passage, dass die verwendeten VSMC sämtliche untersuchten Markerproteine auch nach Expansion in der Zellkultur exprimierten.



**Abbildung 10: Morphologie der VSMC und VSMC-Marker im Western Blot**

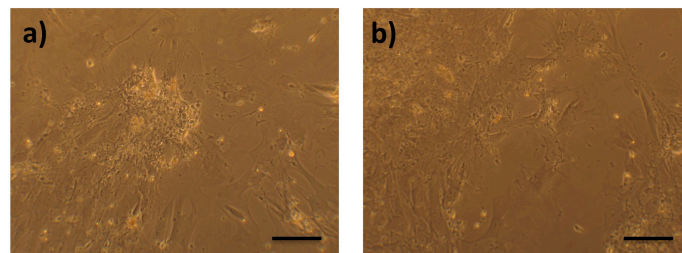
Abgebildet sind VSMC in einer Phasenkontrastaufnahme (Vergrößerung 100x, Balken entspricht 20 µm). Auch nach Expansion in Kultur exprimierten VSMC die typischen glattmuskulären Markerproteine. MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase, SMA: glattmuskuläres Aktin, SM22: glattmuskuläres Protein SM22

#### 4.3 Einfluss des Sekretoms mesenchymaler Stromazellen (MSC) und unterschiedlicher Glukosekonzentrationen auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)

Um zu untersuchen, ob das Sekretom mesenchymaler Stromazellen (MSC) einen protektiven Einfluss auf die Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) hatte, wurden VSMC-Zielzellen mit MSC-konditioniertem Medium (MSC-KM) inkubiert und durch Zugabe der nötigen Faktoren der Kalzifizierungsprozess in den Zielzellen angeregt. Als Kontrolle dienten kalzifizierende VSMC-Zielzellen, die von anderen VSMC konditioniertes Medium erhielten, also Medium, das nicht das Sekretom der MSC enthält.

Einfaches Kulturmedium verblieb zur Konditionierung 2-3 Tage auf den MSC, wurde dann abgenommen, im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem Osteoblastenmedium versetzt und auf die VSMC-Zielzellen übertragen. Mediumwechsel auf den MSC und den Kontroll-VSMC sowie Mediumübertragungen auf die VSMC-Zielzellen wurden alle 2-3 Tage durchgeführt. 7 Tage nach Erstinkubation der VSMC-Zielzellen wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase als früher Marker der osteoblastären Differenzierung gemessen. Nach 14 Tage wurde der Calciumgehalt der VSMC bestimmt.

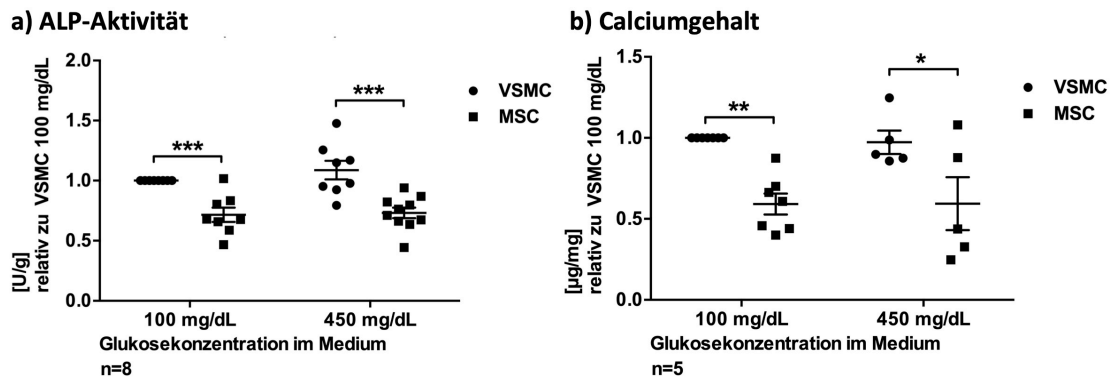
Im Phasenkontrastmikroskop ließ sich der Einfluss des MSC-KM auf die osteoblastäre Transformation der VSMC beobachten (Abbildung 11). Nach 14-tägiger Behandlung mit Osteoblasten-Induktionsmedium konzentrierten sich VSMC haufenartig und zeigten deutliche Anzeichen der Ossifikation (a). Unter der Behandlung mit MSC-KM fielen diese Veränderungen weniger deutlich aus (b). VSMC behielten mehr von ihrem ursprünglichen Phänotyp (vergleiche auch Abbildung 10) und zeigten weniger Calciumablagerungen. Die Messung der ALP-Aktivität nach 7 Tagen und des Calciumgehaltes nach 14 Tagen ergaben jeweils eine signifikante Reduzierung durch die Behandlung mit MSC-KM, nämlich um ca. 30% (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 11: Einfluss des MSC-Sekretoms auf die Kalzifizierung von VSMC**

Abgebildet sind VSMC im Zustand fortgeschrittener osteoblastärer Transformation nach 14-tägiger Behandlung mit Osteoblasteninduktionsmedium. a) Kontrolle, b) MSC-konditioniertes Medium (MSC-KM). Im Vergleich zur Kontrolle a) waren unter der Behandlung mit MSC-KM b) weniger Calciumablagerungen zu erkennen und die VSMC unterzogen sich geringeren phänotypischen Veränderungen. (repräsentative Aufnahmen im Phasenkontrastmikroskop, Balken entspricht 20 µm)

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine hohe Glukosekonzentration im Medium (450 mg/dl bzw. 25 mmol/l) Einfluss auf die osteoblastäre Transformation der VSMC oder auf den Effekt des MSC-Sekretoms hatte. Wie Abbildung 12 zusammenfasst, wiesen auch unter 450 mg/dl Glukose die mit MSC-KM behandelten VSMC im Vergleich zu den Kontrollen eine um ca. 30 % niedrigere ALP-Aktivität und einen verminderten Calciumgehalt auf. Ein signifikanter Einfluss der Glukosekonzentration im Medium auf die ALP-Aktivität oder den Calciumgehalt in den VSMC fand sich hingegen nicht.



**Abbildung 12: Osteoblastäre Transformation glatter Gefäßmuskelzellen unter Einfluss des MSC-Sekretoms und unterschiedlicher Glukosekonzentrationen**

a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle mit 100 mg/dl Glukose normiert. ALP-Aktivität und Calciumgehalt waren in VSMC-Zielzellen, die MSC-konditioniertes Medium erhielten, signifikant vermindert. Es war kein Einfluss der Glukosekonzentration nachweisbar. Signifikanzberechnung: Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### 4.4 Medikamentöse Beeinflussung von MSC-Sekretom und VSMC-Kalzifizierung

Mit weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob der protektive Effekt des MSC-Sekretoms und die Kalzifizierung der VSMC durch Intervention mit den direkt oder indirekt das mTOR-Netzwerk modulierenden Pharmaka Metformin, Insulin oder Rapamycin beeinflusst werden kann.

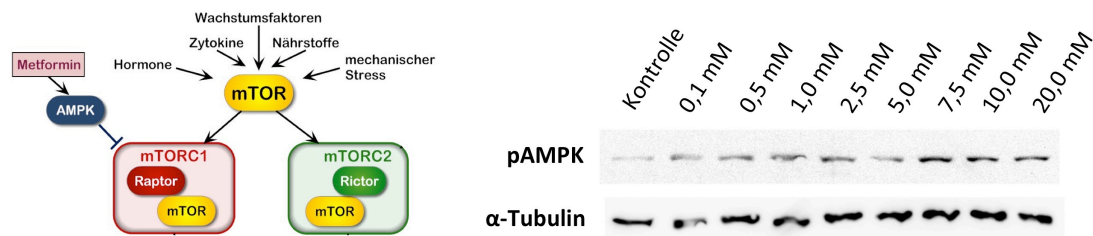
Für die Antidiabetika Metformin und Insulin wurden zunächst Versuche zur Dosisfindung durchgeführt. Der mTORC1-Inhibitor Rapamycin war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und wurde in der Dosis von 20 nM eingesetzt, bei der bekanntermaßen eine weitgehende mTOR-Inhibierung in MSC vorliegt.

##### 4.4.1 Kurzzeitstimulation von MSC mit Metformin- und Insulin-Konzentrationsreihen

Zunächst wurde ermittelt, in welchen Konzentrationen Metformin bzw. Insulin in MSC wirksam waren, also eine Aktivierung der jeweiligen intrazellulären Zielproteine bewirkten. Dazu wurden MSC für 45 min mit Metformin bzw. Insulin in unterschiedlichen Dosierungen behandelt, im Anschluss lysiert und im Western Blot die Phosphorylierung der Zielproteine untersucht.

Indem Metformin intrazellulär die Atmungskette blockiert und zu einer Veränderung der AMP-ATP-Ratio führt, kommt es zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK), die wiederum mTORC1 hemmt (Abbildung 13).<sup>95</sup> MSC, die mit Metformin behandelt wurden, wurden daher 24 Stunden vor der Inkubation auf DMEM 450 mg/dl Glukose und 1 % FCS gesetzt, damit durch ein ausreichendes Angebot an Nährstoffen und

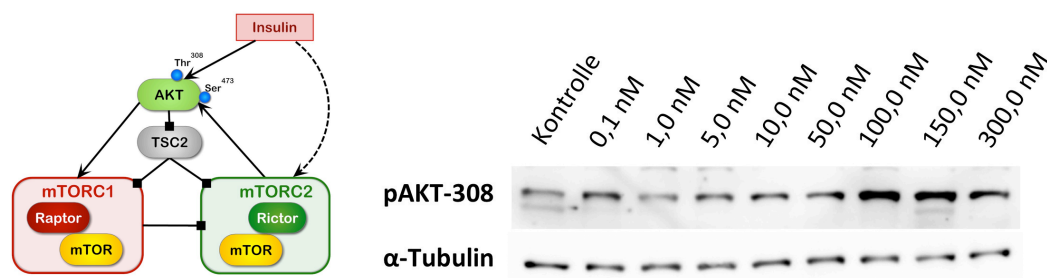
Wachstumsfaktoren eine Grundaktivität des mTOR-Netzwerkes gewährleistet war. Nach eingehender Literaturrecherche wurde der Dosisbereich für Metformin auf 0-20 mM festgelegt<sup>100,118-120</sup>. Im Western Blot konnte eine zunehmende Phosphorylierung der AMPK zwischen 2,5 mM und 10 mM festgestellt werden.



**Abbildung 13: Kurzzeitstimulation mit Metformin-Dosisreihe**

Western-Blot-Analyse von MSC nach 45-minütiger Stimulation mit Metformin. Die Phosphorylierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) als intrazelluläres Target von Metformin nahm zwischen 2,5 mM und 10,0 mM zu. α-Tubulin diente als Ladekontrolle.

Insulin bindet an den membranständigen Insulinrezeptor und bewirkt intrazellulär über die Phosphoinositid-abhängige Kinase PDK1 eine Phosphorylierung der AKT an Position Thr308 (Abbildung 14). Die Zellen wurden daher 24 Stunden vor der Behandlung mit Insulin auf DMEM 100 mg/dl Glukose und 0 % FCS gesetzt, um die Aktivität der zu stimulierenden Signalwege möglichst klein zu halten. Für die Kurzzeitstimulation mit Insulin wurden Konzentrationen zwischen 0 nM und 300 nM gewählt. Eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der AKT an Thr308 als Zeichen der Insulinwirkung konnte im Western Blot bei 100 nM und 150 nM Insulin festgestellt werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Kurzzeitstimulation mit Insulin-Dosisreihe**

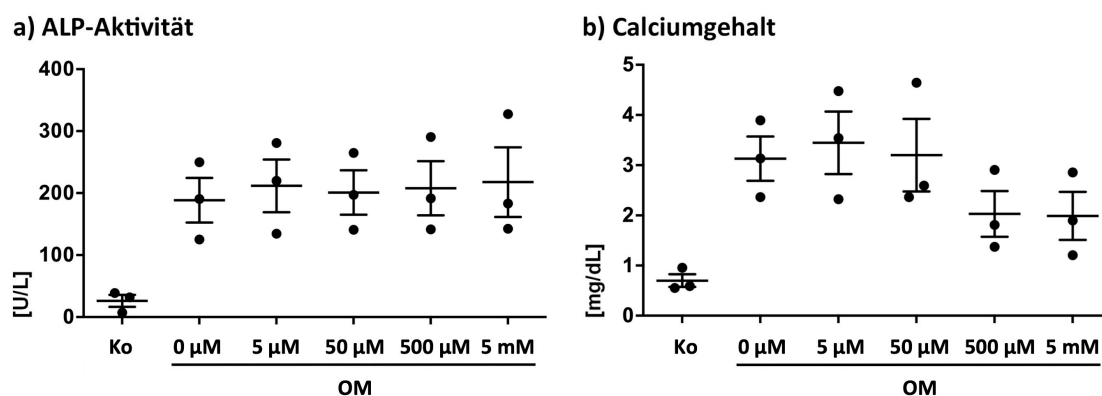
Western-Blot-Analyse von MSC nach 45-minütiger Stimulation mit Insulin. Deutliche Zunahme der Phosphorylierung von AKT an Thr308 als Zeichen der Insulinwirkung bei 100 nM und 150 nM. α-Tubulin als Ladekontrolle.

#### 4.4.2 Langzeitbehandlung mit Metformin- und Insulin-Dosisreihen

Um die Langzeit-Verträglichkeit und mögliche Effekte auf die Kalzifizierung von VSMC zu untersuchen, wurden MSC und kalzifizierende VSMC-Zielzellen bis zu zwei Wochen mit Metformin bzw. Insulin in unterschiedlichen Dosierungen behandelt. MSC erhielten mit dem jeweiligen Wirkstoff versetztes Kulturmedium DMEM mit 450 mg/dl Glukose und 1 % FCS und wurden alle 2-3 Tage mit frischem Medium versorgt. MSC-KM wurde abgenommen, zu Osteoblastenmedium supplementiert, mit Metformin bzw. Insulin versetzt, sodass die gewünschte Konzentration wieder erreicht wurde, und anschließend auf VSMC-Zielzellen übertragen. Nach 7 Tagen wurde die ALP-Aktivität in den VSMC-Zielzellen gemessen, nach 14 Tagen der Calciumgehalt.

Da Metformin mit der verwendeten Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry interferierte und auch nach ausgiebiger Recherche keine alternative Methode gefunden wurde, konnten in diesen und auch in allen weiteren Experimenten mit Metformin die ALP-Aktivität und der Calciumgehalt der Zellen nicht auf die Proteinmenge normiert werden. Stattdessen wurde die ALP-Aktivität in U/l und der Calciumgehalt in mg/dl angegeben.

Nach drei Versuchen mit Metformin-Konzentrationen im Bereich zwischen 5  $\mu$ M und 5 mM zeigte sich, wenngleich statistisch nicht signifikant, ein protektiver Effekt von Metformin auf die Kalzifizierung von VSMC in höheren Dosierungen (Abbildung 15). Die ALP-Aktivität als früher Marker für die osteoblastäre Differenzierung der Zellen wurde durch Zugabe von Metformin nicht beeinflusst. Die Betrachtung im Mikroskop ergab, dass sowohl MSC als auch kalzifizierende VSMC-Zielzellen die eingesetzten Metformin-Konzentrationen gut vertrugen.

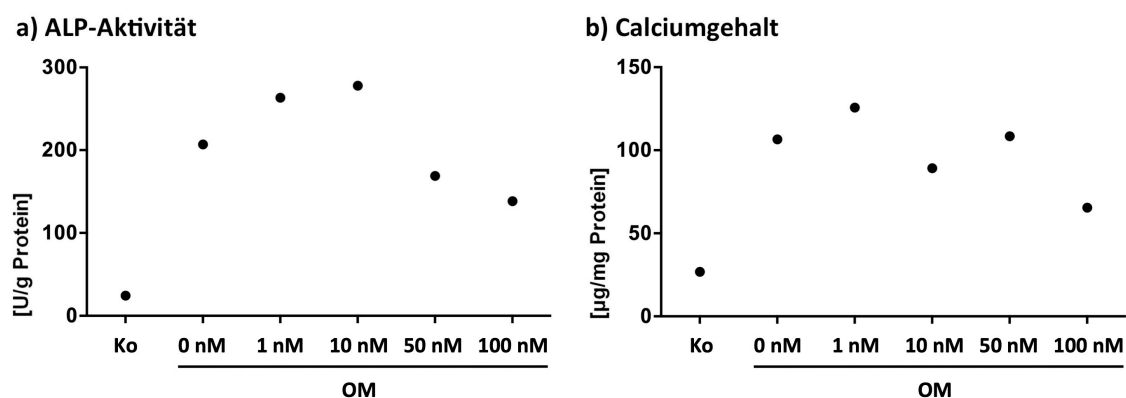


**Abbildung 15: Metformin-Dosisreihe auf kalzifizierenden VSMC**

VSMC erhielten MSC-konditioniertes Osteoblastenmedium (OM) mit Metformin in unterschiedlichen Konzentrationen (0  $\mu$ M bis 5 mM). Ko: Kontrollmedium. a) ALP-Aktivität gemessen 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calcium nach 14 Tagen. Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM. Die Berechnung mit Ein-Weg-ANOVA ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungen mit Osteoblastenmedium in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration. n=3

In einem entsprechenden Versuch mit unterschiedlichen Insulinkonzentrationen zeigten VSMC-Zielzellen, die mit 100 nM Insulin behandelt wurden, eine um ca. 25 % verminderte ALP-Aktivität und einen um ca. 25 % geringeren Calciumgehalt im Vergleich zu VSMC, die kein Insulin erhielten (Abbildung 16).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sowie derer der Kurzzeitstimulation mit unterschiedlichen Metformin- bzw. Insulinkonzentrationen (4.4.1) wurde in weiteren Versuchen mit 5 mM Metformin und 100 nM Insulin gearbeitet.



**Abbildung 16: Insulin-Dosisreihe auf kalzifizierenden VSMC**

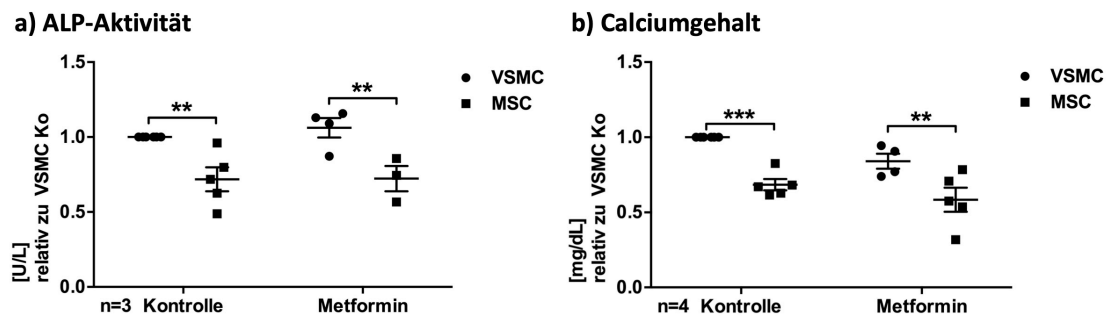
VSMC erhielten MSC-Sekretom-haltiges Osteoblastenmedium (OM) mit Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen (0-100 nM). Ko: Kontrollmedium. a) ALP-Aktivität gemessen 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calcium nach 14 Tage. n=1

#### 4.4.3 Wirkung von Metformin auf MSC-Sekretom und Kalzifizierung der VSMC

Mit einer Metforminkonzentration von 5 mM wurde anschließend untersucht, ob der beschriebene protektive Effekt des MSC-Sekretoms auf die VSMC-Zielzellen (4.3) gesteigert und die Kalzifizierung der VSMC beeinflusst werden kann.

VSMC-Zielzellen erhielten MSC-sekretomhaltiges Osteoblastenmedium mit oder ohne 5 mM Metformin. Als Kontrolle diente wiederum von separat kultivierten VSMC konditioniertes Medium. Zur Mediumkonditionierung kultivierte MSC und VSMC erhielten alle 2-3 Tage frisches Kulturmedium, ebenfalls jeweils mit oder ohne Metformin. Die Überstände wurden vor dem Mediumwechsel abgenommen, zu Osteoblastenmedium ergänzt, wenn nötig mit Metformin versetzt, sodass die Zieldosis erreicht wurde, und anschließend auf die VSMC-Zielzellen übertragen. Die Versuche wurden sowohl mit Medium mit 100 mg/dl Glukose, also wie bei Normoglykämie, als auch mit 450 mg/dl Glukose, erhöhten Blutzuckerwerten bei Diabetikern entsprechend, durchgeführt. Die ALP-Aktivität in den kalzifizierenden VSMC wurde 7 Tage nach Erstinkubation gemessen, der Calciumgehalt nach 14 Tagen.

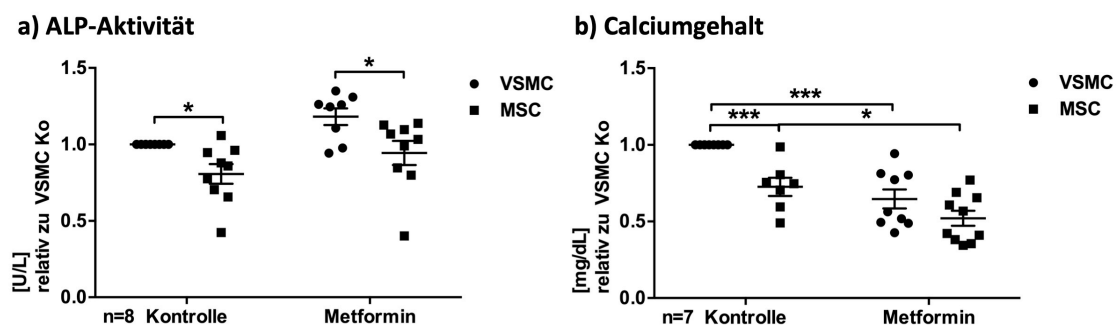
Unter 100 mg/dl Glukose zeigten kalzifizierende VSMC mit MSC-KM signifikant weniger ALP-Aktivität und Calciumablagerungen als jene Kontrollen, die VSMC-konditioniertes Medium erhielten (Abbildung 17). Dieser Effekt wurde durch die Behandlung mit 5 mM Metformin nicht signifikant beeinflusst, wenngleich zu erkennen war, dass mit Metformin behandelte Zellen tendenziell weniger Calciumablagerungen aufwiesen als die jeweilige Vergleichsgruppe.



**Abbildung 17: 100 mg/dl Glukose - Osteoblastäre Transformation von VSMC mit 5 mM Metformin**

VSMC-Zielzellen erhielten MSC-Sekretom-haltiges oder von VSMC konditioniertes Osteoblastenmedium mit oder ohne 5 mM Metformin. a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle normiert. Signifikanzberechnung: Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Auch unter 450 mg/dl Glukose wurde der Effekt des MSC-Sekretoms beobachtet. Darüber hinaus zeigten VSMC-Zielzellen, die mit Metformin behandelt wurden, signifikant weniger Calciumablagerungen als die jeweilige Kontrolle (Abbildung 18). Der Calciumgehalt in den Zellen, die mit MSC-KM und Metformin behandelt wurden, lag fast 50% unter dem Wert derer, die VSMC-konditioniertes Medium und kein Metformin erhielten. Die Behandlung mit Metformin führte jedoch nicht zu geringerer ALP-Aktivität in den kalzifizierenden VSMC.



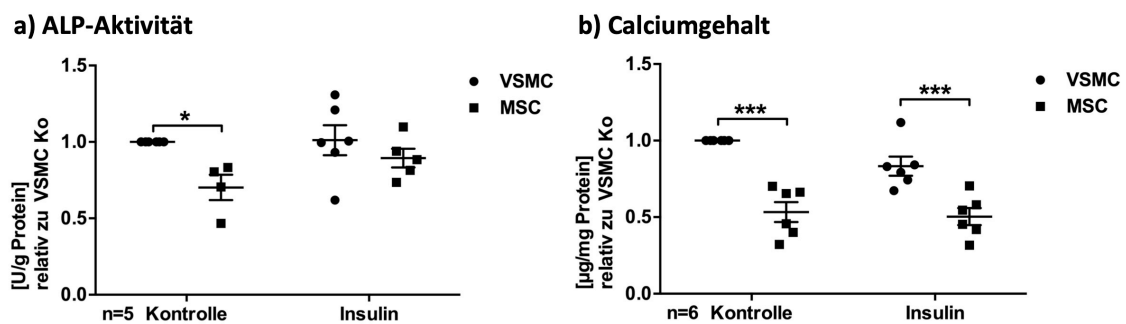
**Abbildung 18: 450 mg/dl Glukose - Osteoblastäre Transformation von VSMC mit 5 mM Metformin**

VSMC-Zielzellen erhielten MSC-Sekretom-haltiges oder von VSMC konditioniertes Osteoblastenmedium, mit oder ohne 5 mM Metformin. a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle normiert. Signifikanzberechnung mit Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$



#### 4.4.4 Wirkung von Insulin auf MSC-Sekretom und Kalzifizierung der VSMC

Die unter 4.4.3 beschriebenen Versuche wurden analog mit 100 nM Insulin durchgeführt, um zu untersuchen, ob das MSC-Sekretom und die Kalzifizierung der VSMC durch Behandlung der Zellen mit Insulin beeinflusst werden können. Sowohl mit 100 mg/dl Glukose als auch mit 450 mg/dl zeigten VSMC-Zielzellen, die MSC-sekretomhaltiges Osteoblastenmedium erhielten, signifikant weniger ALP-Aktivität und Calciumablagerungen als die Kontrollen, die von VSMC konditioniertes Medium erhielten (Abbildungen 19 und 20). Unter 100 mg/dl Glukose wiesen mit Insulin und VSMC-konditioniertem Medium behandelte Zielzellen tendenziell weniger Calciumablagerungen als die Kontrolle auf. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 19).

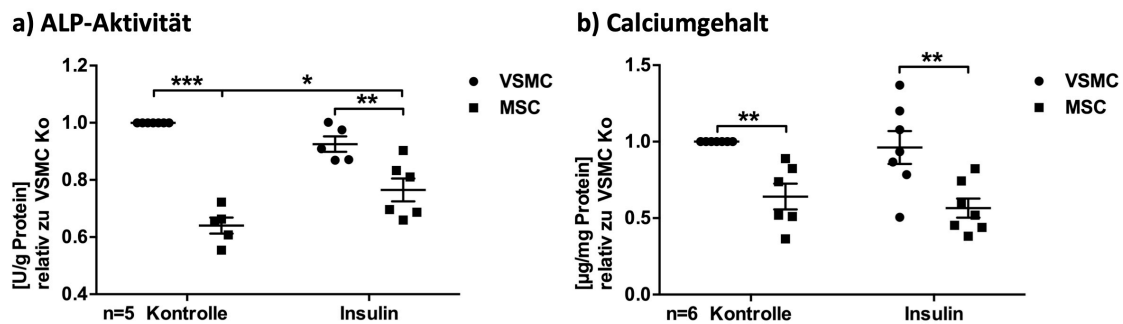


**Abbildung 19: 100 mg/dl Glukose - Osteoblastäre Transformation von VSMC mit 100 nM Insulin**

VSMC-Zielzellen erhielten MSC-Sekretom-haltiges oder von VSMC konditioniertes Osteoblastenmedium mit oder ohne 100 nM Insulin. a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle normiert. Signifikanzberechnung mit Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$

Dieser Effekt der Insulinbehandlung auf den Calciumgehalt der Zielzellen ließ sich unter 450 mg/dl Glukose nicht beobachten. Die gleichzeitige Behandlung mit Insulin auf mit MSC-Sekretom behandelten Zellen führte im Gegenteil zu höherer ALP-Aktivität (Abbildung 20).





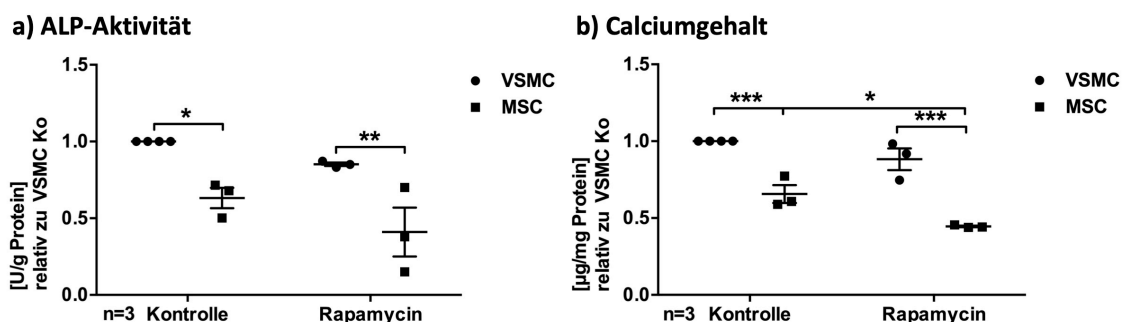
**Abbildung 20: 450 mg/dl Glukose Osteoblastäre Transformation von VSMC mit 100 nM Insulin**

VSMC-Zielzellen erhielten MSC-Sekretom-haltiges oder von VSMC konditioniertes Osteoblastenmedium mit oder ohne 100 nM Insulin. a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle normiert. Signifikanzberechnung mit Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### 4.4.5 Wirkung von Rapamycin auf MSC-Sekretom und Kalzifizierung der VSMC

Die unter 4.4.3 beschriebenen Versuche wurden auch mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin in der Konzentration von 20 nM durchgeführt. Zellen, die nicht mit Rapamycin behandelt wurden, erhielten entsprechende Mengen DMSO als Lösungsmittelkontrolle.

Kalzifizierende VSMC zeigten signifikant weniger ALP-Aktivität und einen geringeren Calciumgehalt, wenn sie mit MSC-KM inkubiert wurden (Abbildungen 21 und 22). Dieser Effekt des MSC-Sekretoms konnte durch die gleichzeitige Behandlung mit Rapamycin gesteigert werden. In Versuchen mit 100 mg/dl Glukose führte der Zusatz von Rapamycin in den mit MSC-KM behandelten Zellen zu signifikant weniger Calciumablagerungen (Abbildung 21).

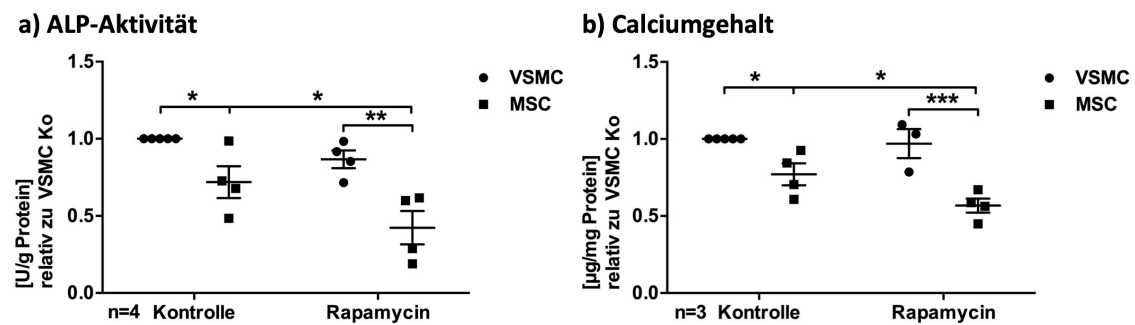


**Abbildung 21: 100 mg/dl Glukose - Osteoblastäre Transformation von VSMC mit 20 nM Rapamycin**

Kalzifizierende VSMC erhielten MSC-Sekretom-haltiges oder von VSMC konditioniertes Osteoblastenmedium mit 20 nM Rapamycin oder DMSO-Lösungsmittelkontrolle. a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle normiert. Signifikanzberechnung mit Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Auch unter 450 mg/dl Glukose im Medium konnte ein geringerer Calciumgehalt durch die gleichzeitige Behandlung mit Rapamycin in VSMC beobachtet werden, die MSC-KM erhielten.

Außerdem wurde die ALP-Aktivität durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit Rapamycin signifikant gesenkt. VSMC, die das MSC-Sekretom und Rapamycin erhielten, wiesen nur ca. 50 % der ALP-Aktivität derjenigen Zielzellen auf, die VSMC-konditioniertes Medium und kein Rapamycin erhielten (Abbildung 22).



**Abbildung 22: 450 mg/dl Glukose - Osteoblastäre Transformation von VSMC mit 20 nM Rapamycin**

VSMC-Zielzellen erhielten MSC-Sekretom-haltiges oder von VSMC konditioniertes Osteoblastenmedium mit 20 nM Rapamycin oder DMSO-Lösungsmittelkontrolle. a) ALP-Aktivität 7 Tage nach Inkubation der VSMC-Zielzellen, b) Calciumgehalt nach 14 Tagen gemessen. Werte auf die VSMC-Kontrolle normiert. Signifikanzberechnung mit Zwei-Weg-ANOVA, Darstellung der Einzelwerte und Mittelwerte mit SEM, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

#### 4.5 Signaltransduktionsanalyse: mTOR-Netzwerk in den mediumkonditionierenden Zellen

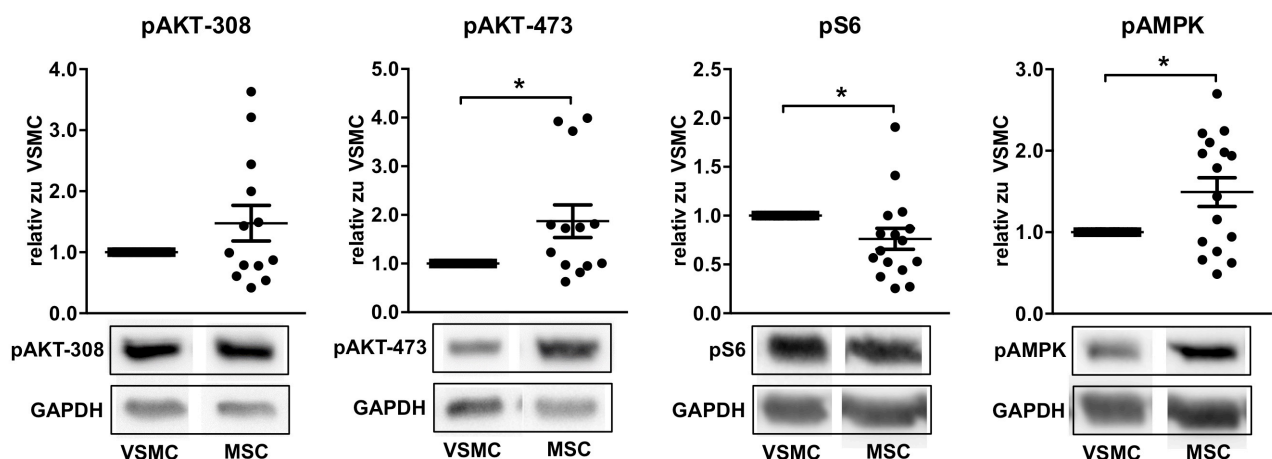
Neben den Versuchen zur Wirkung des MSC-Sekretoms auf die osteoblastäre Transformation der VSMC wurde die Aktivität des mTOR-Netzwerks in den zur Mediumkonditionierung kultivierten MSC und VSMC untersucht. Damit wurde der Frage nachgegangen, ob sich die basale Aktivität des mTOR-Netzwerkes und die Aktivität unter pharmakologischer Präkonditionierung in MSC von glatten Gefäßmuskelzellen unterschied, was möglicherweise Unterschiede in der Wirksamkeit der Überstände auf die osteoblastäre Differenzierung von VSMC erklärt.

Die Zellen wurden nach 1-3 Wochen in Kultur lysiert und für die Western-Blot-Analyse aufbereitet. Die Aktivität des mTOR-Netzwerkes wurde anhand folgender Marker untersucht: pAKT-308 als Zeichen der Aktivierung von AKT durch den Insulin-Signalweg, pAKT-473 als Marker für die mTORC2-Aktivität, pS6 als *downstream-target* zur Abschätzung der mTORC1-Aktivität und schließlich pAMPK als Sensor des intrazellulären Energielevels sowie als Inhibitor von mTORC1. Die detektierten Banden wurden densitometrisch quantifiziert und stets auf eine Ladekontrolle ( $\alpha$ -Tubulin oder GAPDH) normiert.

#### 4.5.1 Vergleich der basalen Aktivität von mTOR in MSC und VSMC

Zunächst wurde die Signaltransduktion in den unbehandelten Zellen untersucht, also ohne gleichzeitige pharmakologische Behandlung. Für MSC gemessene Werte wurden mit den korrespondierenden VSMC verglichen und zu diesen ins Verhältnis gesetzt.

MSC wiesen mehr phosphorylierte AKT als VSMC auf: an der Position Thr308 um den Faktor 1,5 und an Ser473 um den Faktor 2. Die vermehrte AKT-473-Phosphorylierung in MSC war auch statistisch signifikant und sprach für eine höhere mTORC2-Aktivität in MSC. Phosphoryliertes ribosomales Protein S6 wurde in MSC signifikant weniger als in VSMC nachgewiesen, nämlich um ca. 25 %. Dies deutete auf eine geringere mTORC1-Aktivität in MSC hin. Im Vergleich zu VSMC wiesen MSC außerdem 1,5fach mehr phosphorylierte AMPK. (Abbildung 23)



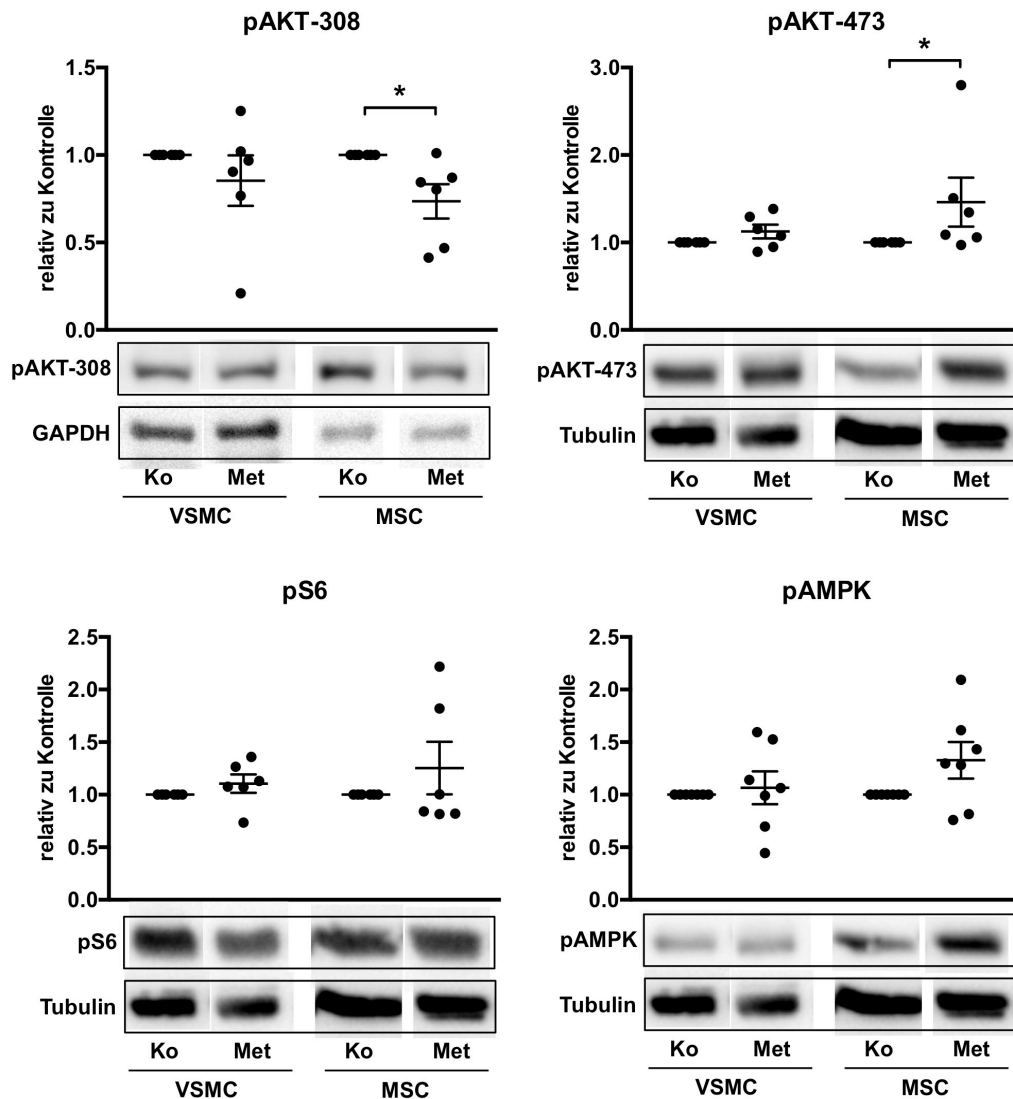
**Abbildung 23: Vergleich der basalen Aktivität des mTOR-Netzwerkes in MSC und VSMC**

Nach 1 bis 3 Wochen in Kultur wurde in unbehandelten MSC und VSMC die mTOR-Netzwerk-Aktivität mittels Western Blot analysiert. MSC wiesen signifikant mehr pAKT-473 und pAMPK auf. Phosphoryliertes ribosomales Protein S6 war in MSC signifikant weniger vorhanden als in VSMC. Dargestellt sind für MSC gemessene Werte relativ zu den korrespondierenden VSMC als Einzelwerte sowie Mittelwerte und SEM. Signifikanzberechnung mit gepaartem t-Test, \* $p < 0,05$ ,  $n=13$  für pAKT308, pAKT-473 bzw.  $n=16$  für pS6, pAMPK

#### 4.5.2 mTOR-Netzwerk in mit Metformin präkonditionierten Zellen

Analog zum obigen Vorgehen wurden dieselben Marker auch in MSC und VSMC untersucht, die mit Metformin präkonditioniert wurden. Dabei war zum einen von Interesse, wie die Langzeitbehandlung mit Metformin das Phosphorylierungsmuster der untersuchten Marker in MSC und VSMC veränderte. Zum anderen sollte untersucht werden, ob sich die Veränderungen in den Aktivierungsgraden zwischen MSC und VSMC unterschieden.

Wie Abbildung 24 zeigt, reduzierte die Behandlung mit Metformin pAKT-308 in MSC signifikant um ca. 25 %. In mit Metformin behandelten VSMC fiel diese Veränderung schwächer und statistisch nicht signifikant aus. In MSC bewirkte Metformin eine ca. 1,5fach Vermehrung von pAKT-473, nicht so jedoch in VSMC. Die Behandlung mit Metformin übte weder in VSMC noch in MSC einen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 als Marker der mTORC1-Aktivität aus. Anders als durch Kurzzeitstimulation wurde durch die Langzeitbehandlung mit Metformin keine signifikante Zunahme von phosphorylierter AMPK beobachtet. Lediglich eine tendenzielle Zunahme von pAMPK in MSC um den Faktor 1,3 deutete auf eine verstärkte AMPK-Aktivierung hin.



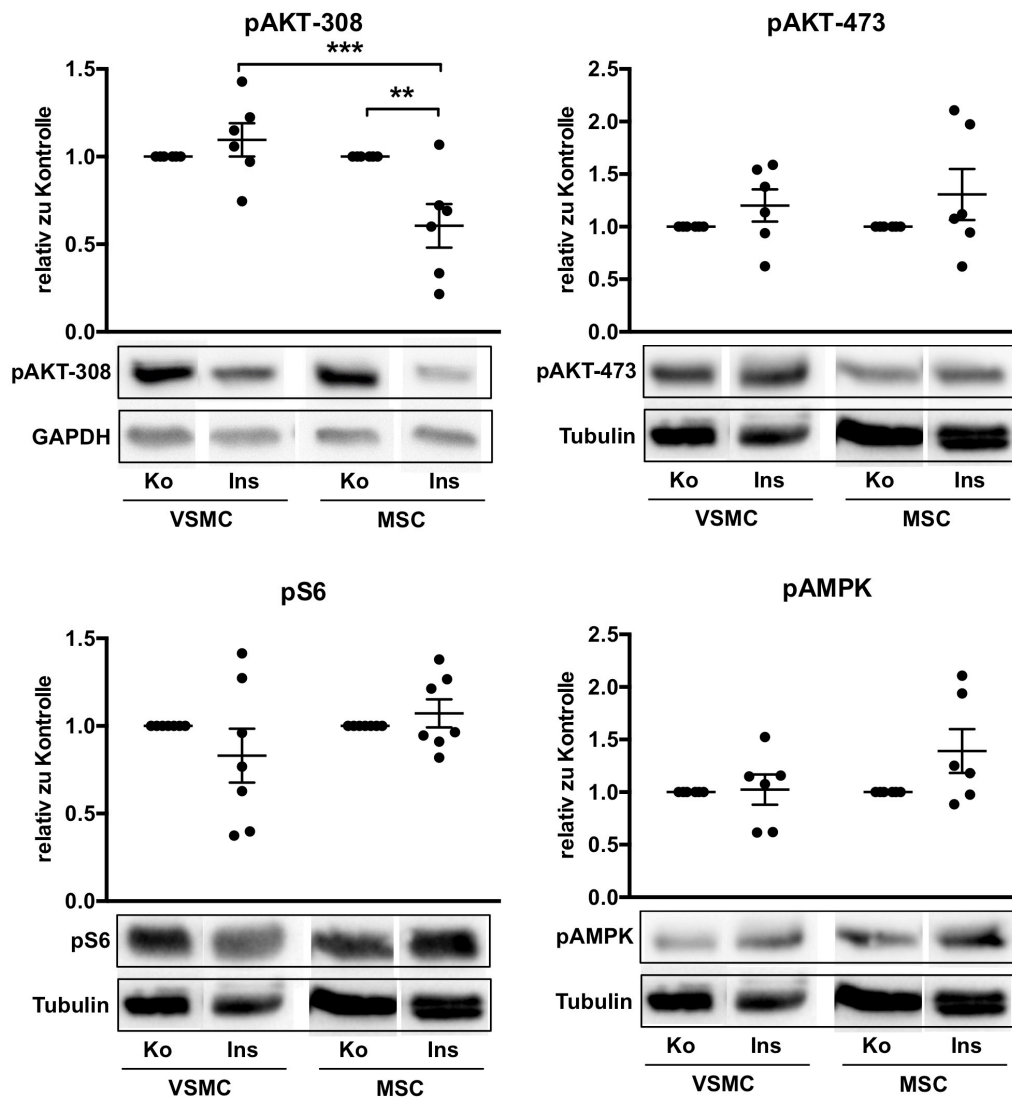
**Abbildung 24: Signaltransduktion in MSC und VSMC unter Metformin 5 mM**

Western Blots nach 1-3 Wochen in Kultur ohne (Ko) oder mit Metformin (Met). Metformin bewirkte in VSMC eine leichte und in MSC eine stärkere, statistisch signifikante Reduktion von Thr-308-phosphorylierter AKT, außerdem in MSC eine leichte Zunahme von pAKT-473. Metformin übte weder in VSMC noch in MSC einen signifikanten Einfluss auf pS6 oder pAMPK aus. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen MSC und VSMC im Aktivierungsmuster der untersuchten Proteine. Dargestellt sind die relativen Werte bezogen auf die jeweilige Kontrolle als Einzelwerte sowie Mittelwerte und SEM. Signifikanzberechnung mit 2-Weg-ANOVA, \* $p < 0,05$ .  $n=6$  für pAKT-308, pAKT-473, pS6 bzw.  $n=7$  für pAMPK

#### 4.5.3 mTOR-Netzwerk in mit Insulin präkonditionierten Zellen

Analog zu 4.5.2 wurden die Phosphorylierungsmuster in den mit Insulin behandelten Zellen untersucht. Im Gegensatz zur Kurzzeitstimulation führte die Langzeitbehandlung mit Insulin weder in MSC noch in VSMC zu einer Zunahme von pAKT-308. Es fiel im Gegenteil eine signifikante Reduktion der Menge von Thr308-phosphorylierter AKT um ca. 40 % in mit Insulin behandelten MSC auf. Dies wurde in VSMC nicht beobachtet. Die Abnahme von pAKT-308 in

MSC unter der Präkonditionierung mit Insulin war auch im Vergleich zu den mit Insulin-behandelten VSMC signifikant. In der Auswertung der weiteren untersuchten Marker pAKT-473, pS6 und pAMPK zeigte sich keine signifikante Stimulation oder Inhibition in MSC oder VSMC durch die Behandlung mit Insulin. Es ließen sich lediglich ein Trend zu stärkerer S6-Phosphorylierung und AMPK-Aktivierung durch Insulin in MSC erkennen. (Abbildung 25)

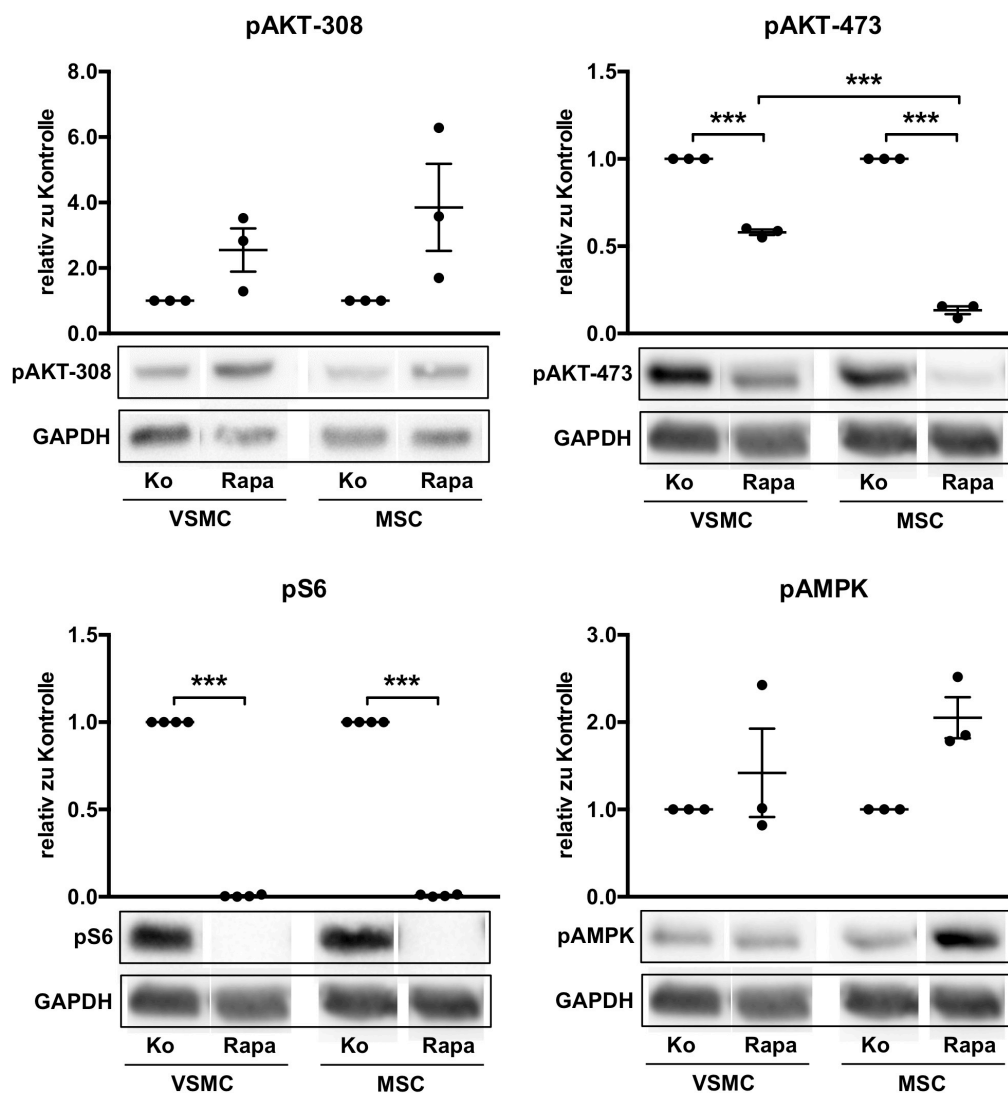


**Abbildung 25: Signaltransduktion in MSC und VSMC unter 100 nM Insulin**

Western Blots nach 1-3 Wochen in Kultur ohne (Ko) oder mit Insulin (Ins). In MSC führte die Behandlung mit Insulin, anders als in VSMC, zu einer signifikanten Abnahme von pAKT-308. Diese Reaktion auf die Behandlung mit Insulin unterschied sich signifikant zwischen VSMC und MSC. Ansonsten ließen sich keine signifikanten Effekte auf die Aktivität des mTOR-Netzwerkes durch die Behandlung mit Insulin feststellen. Dargestellt sind die relativen Werte bezogen auf die jeweilige Kontrolle als Einzelwerte sowie Mittelwerte und SEM. Signifikanzberechnung mit 2-Weg-ANOVA, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .  $n=6$  für pAKT-308, pAKT-473, pAMPK bzw.  $n=7$  für pS6

#### 4.5.4 mTOR-Netzwerk in mit Rapamycin präkonditionierten Zellen

Auch in den mit Rapamycin behandelten MSC und VSMC wurden die Phosphorylierungsmuster der beschriebenen Marker untersucht. Rapamycin bewirkte eine nahezu vollständige Inhibierung der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 (Abbildung 26). Auch pAKT-473 als Marker für die mTORC2-Aktivität wurde durch die Behandlung mit Rapamycin sowohl in MSC (um 85%) als auch in VSMC (um 40%) signifikant vermindert. Der Einfluss von Rapamycin auf die mTORC2-Aktivität unterschied sich in MSC und VSMC signifikant. Sowohl MSC als auch VSMC wiesen unter Rapamycin zudem tendenziell mehr pAKT-308 und pAMPK auf. Dabei fiel die Reaktion auf Rapamycin in MSC stärker als in VSMC aus.



**Abbildung 26: Signaltransduktion in MSC und VSMC unter Rapamycin 20 nM**

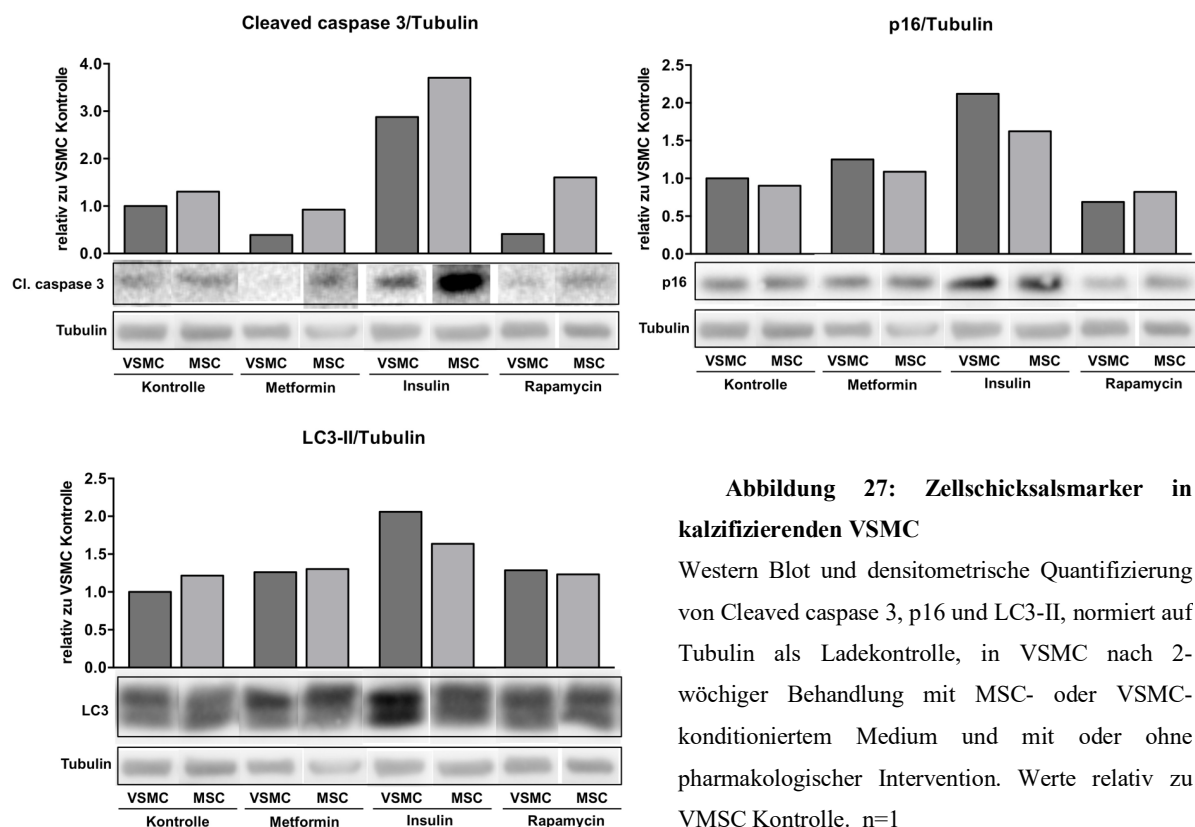
Western Blots nach 1-3 Wochen in Kultur ohne (Ko) oder mit Rapamycin (Rapa). Rapamycin führte sowohl in VSMC als auch in MSC zu einer subtotalen Inhibierung von S6 sowie zu einer deutlichen Reduktion von pAKT-473, letztere in MSC signifikant stärker ausgeprägt als in VSMC. Außerdem führte Rapamycin zu einer tendenziellen Zunahme von pAKT-308 und pAMPK in VSMC und – deutlicher – in MSC. Dargestellt sind die relativen Werte bezogen auf die jeweilige Kontrolle als Einzelwerte sowie Mittelwerte und SEM. Signifikanzberechnung mit 2-Weg-ANOVA, \*\*\* $p < 0,001$ .  $n=3$  für pAKT-308, pAKT-473, pAMPK bzw.  $n=4$  für pS6

#### 4.6 Zellschicksalsprogramme in kalzifizierenden VSMC

Abschließend sollte in dieser Arbeit ein Ansatz zur mechanistischen Erklärung des MSC-Sekretoms verfolgt werden. Unter der Annahme, dass Zellschicksalsprogramme wesentlich für die Zelldifferenzierung sind und zahlreiche Bestandteile des MSC-Sekretoms sowie die zusätzlichen pharmakologischen Interventionen Zellschicksalsprogramme in VSMC beeinflussen, wurden drei Zellschicksalsprogramme, die eine zentrale regulatorische Funktion im Kalzifizierungsprozess einnehmen, anhand von Markerproteinen untersucht: die Apoptose anhand von Cleaved caspase 3, die Zellseneszenz anhand des Markerproteins p16-INK4a (kurz: p16) und die Autophagie stellvertretend für die LC3-Proteine anhand von LC3B.

Die untersuchten VSMC wurden über 14 Tage unter pro-kalzifizierenden Bedingungen kultiviert und erhielten MSC-KM mit oder ohne pharmakologische Behandlung. Als Kontrolle dienten kalzifizierende VSMC, die von anderen VSMC konditioniertes Medium erhielten. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Da der Versuch nur einmal durchgeführt wurde, entfiel die statistische Auswertung.

Es ließen sich keine wesentlichen Auswirkungen des MSC-Sekretoms auf die Marker für Apoptose, Seneszenz oder Autophagie ausmachen (Abbildung 27: MSC Kontrolle verglichen mit VSMC Kontrolle). Die Behandlung mit Metformin und mit Rapamycin führte zu einer Verminderung des Apoptose-Markers Cleaved caspase 3 in den kalzifizierenden Zellen, die kein



**Abbildung 27: Zellschicksalsmarker in kalzifizierenden VSMC**

Western Blot und densitometrische Quantifizierung von Cleaved caspase 3, p16 und LC3-II, normiert auf Tubulin als Ladekontrolle, in VSMC nach 2-wöchiger Behandlung mit MSC- oder VSMC-konditioniertem Medium und mit oder ohne pharmakologischer Intervention. Werte relativ zu VSMC Kontrolle. n=1



MSC-KM erhielten. Die Behandlung mit Insulin hingegen führte zu einer deutlichen Erhöhung des Apoptosemarkers. Die mit MSC-KM behandelten Zellen wiesen tendenziell mehr Cleaved caspase 3 als die Kontrollen auf. Der Seneszenz-Marker p16 wurde durch die Behandlung mit Rapamycin leicht reduziert. Mit Insulin behandelte Zellen wiesen hingegen deutlich mehr p16 als unbehandelte Zellen auf. Der Autophagie-Marker LC3 wurde durch die Behandlung der Zellen mit Metformin oder mit Rapamycin nicht wesentlich beeinflusst. Insulin jedoch bewirkte einen Anstieg von LC3-II, was für einen Einfluss auf zelluläre Autophagie spricht, der jedoch nicht weiter untersucht wurde.

## 5 Interpretation und Diskussion

---

### 5.1 Unveränderte Kalzifizierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) unter 100 mg/dl und 450 mg/dl Glukose

---

Diabetiker leiden an einem deutlich erhöhten kardiovaskulären Risiko.<sup>3,4,121</sup> Klinische Studien zeigten, dass dieses Risiko durch frühzeitige konsequente Blutzuckereinstellung günstig beeinflusst wird.<sup>7,13</sup> Es wurde daher in dieser Arbeit untersucht, ob die osteoblastäre Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) durch unterschiedliche Glukose-Konzentrationen beeinflusst wird. Dazu wurde die Kalzifizierung von VSMC in Kulturmedien mit 100 mg/dl und 450 mg/dl Glukose, normoglykämischen bzw. hyperglykämischen Bedingungen entsprechenden Konzentrationen, untersucht. Die Messung der alkalischen Phosphatase (ALP)-Aktivität und des Calciumgehaltes der VSMC zeigten keinen Effekt durch die supraphysiologische Glukosekonzentration von 450 mg/dl auf die osteoblastäre Transformation der VSMC. Insbesondere kalzifizierten VSMC im Vergleich zur physiologischen Glukosekonzentration von 100 mg/dl nicht stärker.

Im verwendeten in vitro-Modell wurde kein direkter Einfluss der beiden Glukosekonzentrationen auf die osteoblastäre Differenzierung von VSMC nachgewiesen. Dies lässt vermuten, dass sich die in klinischen Studien beobachteten protektiven Effekte durch eine frühzeitige Blutzucker-Normalisierung durch ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren erklären lassen, die in dem hier verwendeten Modell nicht zum Tragen kamen, oder dass es sich um im Zellkulturmodell nicht nachvollziehbare Langzeiteffekte handelt. In der Literatur wird der Interaktion zwischen dysfunktionalen Endothelien und VSMC eine große Bedeutung zugeschrieben. Hyperglykämien stören das Gleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in Endothelzellen.<sup>29</sup> Glukoseüberschuss führt zu übermäßiger Produktion von ROS in den Mitochondrien.<sup>45</sup> Dies fördert die Bildung von *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), was wiederum die Entstehung weiterer ROS zur Folge hat.<sup>45,122</sup> Des Weiteren spielt die häufig mit Diabetes assoziierte Adipositas aufgrund der inkretorischen Funktionen der Adipozyten eine wichtige Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen.<sup>29</sup> Adipozyten befördern ein proinflammatorisches Milieu.<sup>29</sup> Die vermehrte Oxidierung freier Fettsäuren führt zur Bildung von ROS und sogenannte Adipokine wie Leptin, von Adipozyten gebildete Mediatoren, nehmen Einfluss auf die VSMC-Funktion.<sup>29</sup>

Im verwendeten Modell wurde die osteoblastäre Transdifferenzierung der VSMC als zentraler Punkt der Entstehung der Mediasklerose untersucht. Entsprechend blieben Endothel-VSMC-Interaktion sowie über die Schwankungen der Glukosekonzentration hinausgehende Milieuveränderung bei Diabetes mellitus unberücksichtigt. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit kein direkter Einfluss der beiden Glukosekonzentrationen auf die Kalzifizierung der VSMC nachgewiesen wurde.

## 5.2 Das Sekretom mesenchymaler Stromazellen (MSC) schützt VSMC vor Kalzifizierung

---

In dieser Arbeit wurde das regenerative Potential des Sekretoms mesenchymaler Stromazellen für die Prävention und die Behandlung der Mediasklerose untersucht. Dazu wurde MSC-konditioniertes Medium (MSC-KM) auf kalzifizierende VSMC übertragen. In den durchgeführten Versuchen am in vitro-Modell konnte ein signifikanter protektiver Effekt durch MSC-KM nachgewiesen werden. Dieser zeigte sich auch unabhängig von den beiden verwendeten Glukosekonzentrationen. Die ALP-Aktivität als Marker der frühen osteoblastären Differenzierung der VSMC konnte durch Behandlung mit dem MSC-Sekretom um 25 %, der Calciumgehalt in den kalzifizierenden VSMC sogar um 30 % reduziert werden.

Das regenerative Potential der MSC wird in vielen Gebieten der Medizin genutzt, auch zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, nach derzeitigem Stand jedoch nicht zur Therapie der Mediasklerose.<sup>67,111</sup> Mit dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass MSC-KM glatte Gefäßmuskelzellen vor Kalzifizierung schützt und damit einen Ansatz zur Prävention und Therapie der Mediasklerose bieten könnte.

### 5.2.1 Erklärungsansätze für die Protektion durch das MSC-Sekretom

---

In den durchgeführten Experimenten wurde nicht untersucht, über welche Mediatoren das MSC-KM der osteoblastären Differenzierung der VSMC entgegenwirkte. Dennoch erscheint diese Frage, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung des MSC-Sekretoms, von großem Interesse. Zahlreiche Arbeiten untersuchten die Zusammensetzung des MSC-Sekretoms. Je nach Mikroumgebung, ob in vitro oder in vivo und je nach Gewebeansprung der MSC variiert dabei jedoch die Zusammensetzung.<sup>76</sup> Diese Faktoren erschweren einerseits die eindeutige Charakterisierung des MSC-Sekretoms und müssen andererseits in der Bewertung des MSC-Sekretoms berücksichtigt werden.

### 5.2.1.1 Von MSC sezernierte Mediatoren

---

Das MSC-Sekretom enthält zahlreiche Mediatoren: Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Lipide und Matrixproteasen.<sup>76</sup> Unter den in vitro in großen Mengen sezernierten Faktoren sind die Interleukine IL-6 und IL-8, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2* (TIMP-2), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) zu nennen.<sup>123</sup> Park et al. konnten zeigen, dass diese Faktoren von MSC dreier unterschiedlicher Spender konstant exprimiert werden.<sup>123</sup>

Interessante Hinweise auf die Wirkungsweise des MSC-Sekretoms lassen sich aus einer in vitro-Studie von Sun et al. ziehen, die die Wirkung von MSC-KM auf die Proliferation und Funktion von Osteoblasten untersuchten.<sup>124</sup> Die Autoren zeigten, dass MSC-KM nach 3-tägiger Behandlung sowohl die Proliferation als auch die ALP-Aktivität in Osteoblasten senkte.<sup>124</sup> MSC-KM reduzierte in Osteoblasten die Expression der Osteoblasten-Marker Osteocalcin und Osteopontin.<sup>124</sup> Auch der Transkriptionsfaktor Runx2 wurde nach 3 Tagen vermindert exprimiert.<sup>124</sup> Sun et al. beobachteten zudem eine Abhängigkeit aller Effekte von der Dosierung des MSC-KM.<sup>124</sup>

Die osteochondrozytäre Transdifferenzierung von VSMC ist der zentrale Prozess in der Pathogenese der Mediasklerose.<sup>28</sup> Auch wenn Osteoblasten und kalzifizierende VSMC nicht gleichgesetzt werden dürfen und sie sich in ihren globalen Proteinexpressionsmustern unterscheiden<sup>125</sup>, lassen sich doch gewisse Rückschlüsse für diese Arbeit ziehen, denn die osteoblastäre Differenzierung von VSMC wird zu wesentlichen Teilen durch den Transkriptionsfaktor Runx2 vermittelt.<sup>51</sup> Die Vermutung liegt daher nahe, dass MSC-KM die Kalzifizierung der VSMC über eine verminderte Runx2-Expression verhindert, ähnlich wie Sun et al. dies für Osteoblasten zeigten.

Japanische Forscher untersuchten die Wirkung des MSC-Sekretoms auf die Knochenregeneration. Ogata et al. erforschten die Wirkung von serumfreiem MSC-KM bei Bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrose des Kiefers im Rattenmodell.<sup>126</sup> 2 Wochen nach intravenöser Injektion zeigten 63 % der Ratten, die MSC-KM erhalten hatten, deutliche makroskopische und mikroskopische Zeichen der Regeneration, während mit unconditioniertem DMEM behandelte Ratten keine Anzeichen der Heilung zeigten.<sup>126</sup> MSC-KM führte zu weniger Apoptose und Inflammation in den betroffenen Knochen.<sup>126</sup> In einer kleinen Patientenstudie (n=8) mit lokaler Anwendung von MSC-KM wiesen Katagiri et al. ähnliche anti-inflammatorische Effekte auf die Alveolarknochen-Regeneration nach.<sup>127</sup>

Ando et al. untersuchten die Wirkung von MSC-KM in einem Mausmodell für Distraktionsosteogenese.<sup>128</sup> Die Autoren applizierten serumfreies MSC-KM in einer Kollagenbasis lokal in den Frakturspalt.<sup>128</sup> Im Gegensatz zu nicht-konditioniertem Medium beschleunigte das MSC-KM die Kallusbildung im Frakturspalt.<sup>128</sup> Als Mediatoren dieses Effekts identifizierten Ando et al. MCP-1 und MCP-3 für die Rekrutierung von MSC sowie die Interleukine IL-3 und IL-6.<sup>128</sup>

Diese Beobachtungen scheinen den Ergebnissen von Sun et al.<sup>124</sup> zunächst zu widersprechen, konnten Sun et al. doch zeigen, dass MSC-KM über eine verminderte Expression von Runx2 die Differenzierung von Osteoblasten inhibiert. Die von Ando et al. und Ogata et al. berichteten positiven Effekte von MSC-KM auf die Knochenregeneration waren jedoch vor allem durch die Rekrutierung endogener MSC und die Wirkung anti-inflammatorischer und anti-apoptotischer Mediatoren zu erklären.<sup>126,128</sup> Dadurch ergeben sich zwei mögliche, komplementäre Erklärungsansätze für die in dieser Arbeit beobachtete Wirkung des MSC-Sekretoms auf VSMC: Zum einen könnte MSC-KM wie auch in Osteoblasten über eine verminderte Runx2-Expression die osteoblastäre Differenzierung von VSMC bremsen. Zum anderen könnten enthaltene anti-apoptotisch wirksame Mediatoren zu verminderter Apoptose in VSMC führen. Da die Apoptose und die entstehenden *apoptotic bodies* die Kalzifizierung von VSMC befördern – anders als in den Modellen der Knochenregeneration, in denen die Apoptose von Osteoblasten in einer verminderten Knochenbildung resultiert –, könnte durch anti-apoptotische Mediatoren die Kalzifizierung der VSMC reduziert werden.

#### 5.2.1.2 Exosomen und microRNA

Neben den oben beschriebenen freigesetzten Mediatoren sezernieren MSC Exosomen.<sup>129</sup> Darunter versteht man 30 bis 100 nm durchmessende Vesikel, die wiederum zahlreiche Mediatoren enthalten: Proteine, Lipide und Nukleinsäuren, darunter auch microRNA (miRNA).<sup>129</sup> Durch die umgebende Phospholipid-Hülle sind die Mediatoren in den Exosomen vor enzymatischem Abbau geschützt.<sup>129</sup> Exosomen können in vivo von benachbarten Zellen oder nach Zirkulation im Körper auch von weit entfernten Zellen rezeptorvermittelt aufgenommen werden.<sup>130</sup>

Die von MSC produzierten Exosomen sind in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand der Forschung geworden. Da sie weniger immunogen als MSC selbst sind und besser gelagert werden können, sind sie für zellfreie regenerative Therapieansätze von Interesse.<sup>131</sup> Feng et al. zeigten, dass von MSC produzierte Exosomen eine anti-apoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten ausübten, die durch miRNA-22 vermittelt wurde.<sup>132</sup> Arslan et al. untersuchten

die Wirkung von MSC-Exosomen bei myokardialer Ischämie im Mausmodell.<sup>133</sup> MSC-Exosomen reduzierten die lokale und systemische Inflammation sowie den oxidativen Stress und führten zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion nach 28 Tagen.<sup>133</sup>

miRNA sind nicht-kodierende RNA-Sequenzen mit einer Länge von ca. 20 Basenpaaren.<sup>134</sup> Durch Bindung an eine Ziel-mRNA können sie deren Abbau induzieren und dadurch die Proteinexpression regulieren.<sup>134</sup> Da eine Ziel-mRNA jedoch von unterschiedlichen miRNA reguliert werden kann und gleichzeitig eine miRNA unterschiedliche mRNA als Ziel haben kann, ergibt sich ein komplexes Zusammenspiel, das bis heute nicht vollständig entschlüsselt ist.<sup>135</sup> Extrazelluläre miRNA, verpackt in Vesikeln oder gebunden an Proteine, fungieren als wichtige Mediatoren zwischen Zellen<sup>134</sup> und spielen auch in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle<sup>136</sup>. So regulieren miRNAs den VSMC-Phänotyp: Dysregulation der miRNA-Cluster 21, 143 und 145 sind mit einer Veränderung vom kontraktile zum synthetischen VSMC-Phänotyp assoziiert.<sup>137</sup> Es sind außerdem miRNA bekannt, die die osteoblastäre Transdifferenzierung von VSMC beeinflussen: Eine Dysregulation der miRNA-125b kann durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Osterix die ALP-Aktivität in VSMC in vitro steigern und deren Kalzifizierung befördern.<sup>136</sup> Mit der miRNA-204 ist auch ein Inhibitor der VSMC-Kalzifizierung bekannt.<sup>136</sup> Die Überexpression von miRNA-204 im pro-arteriosklerotischen Mausmodell konnte die Mediasklerose und die Runx2-Expression in VSMC reduzieren.<sup>136</sup> An Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, chronischer Niereninsuffizienz und koronarer Herzkrankheit wurden die Serum- bzw. Plasmaspiegel zahlreicher miRNA untersucht.<sup>136</sup> Goettsch et al. verglichen die Ergebnisse dieser Studien und fanden heraus, dass die Spiegel von miRNA-21 in allen Patientengruppen vermindert waren.<sup>136</sup>

Zum einen wird deutlich, dass die allgemeinen Effekte des MSC-Sekretoms zumindest teilweise durch Exosomen und auch durch darin enthaltene miRNA vermittelt werden. Zum anderen spielen miRNA eine Rolle in der Entstehung der Mediasklerose. Die Schlussfolgerung liegt also nahe, dass die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der VSMC-Kalzifizierung durch das MSC-KM durch miRNA vermittelt worden sein könnten, auch wenn der Stand der Forschung derzeit noch keine direkte Verbindung zwischen den von MSC sezernierten miRNA und der VSMC-Kalzifizierung zulässt.

### 5.3 Verstärkte Protektion durch Metformin und Rapamycin, nicht jedoch durch Insulin

---

Die Literatur beschreibt unterschiedliche Ansätze für die Präkonditionierung von MSC, von der Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen oder unter Serumentzug bis hin zur genetischen Modifikation.<sup>76</sup> Mit der Präkonditionierung der MSC wird im Allgemeinen das Ziel

verfolgt, entweder das Überleben der Zellen nach Transplantation zu fördern oder das Sekretom der MSC zu modulieren.<sup>76</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde der Ansatz der pharmakologischen Präkonditionierung gewählt. Nach Versuchen zur Dosisfindung wurden MSC mit 5 mM Metformin, 100 nM Insulin oder 20 nM Rapamycin behandelt. Neben Lösungsmittelkontrollen dienten wiederum separat zur Mediumkonditionierung kultivierte VSMC, die jeweils dieselbe pharmakologische Behandlung wie MSC erhielten, als Kontrolle. Konditioniertes Kulturmedium wurde zu Osteoblastenmedium supplementiert, mit dem jeweiligen Pharmakon angereichert, sodass konstante Konzentrationen gewährleistet wurden, und anschließend auf die kalzifizierenden VSMC übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlungen mit Rapamycin und Metformin zu geringerer Kalzifizierung der VSMC führten.

Unter hohen Glukosekonzentrationen verringerte Metformin die Calciumablagerungen in allen kalzifizierenden VSMC. Die Behandlung mit Metformin bewirkte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine zusätzliche Absenkung des Calciumgehaltes in denjenigen VSMC, die MSC-KM erhielten. Damit wurde gezeigt, dass das weit verbreitete orale Antidiabetikum Metformin einen protektiven Effekt auf die VSMC-Kalzifizierung als einen zentralen Prozess in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Komplikationen bei Diabetikern nehmen kann. Es ergibt sich die Frage, ob der beobachtete Effekt auf eine Modulation des MSC-Sekretoms durch Metformin oder auf die Addition der Effekte von MSC-KM und Metformin zurückzuführen ist. Einschränkend ist festzuhalten, dass die verwendete Metforminkonzentration von 5 mM deutlich über den für die klinische Anwendung empfohlenen Plasmaspiegeln lag (ca. 1,0 mg/l bzw. 7,7  $\mu$ M).<sup>138-140</sup> Allerdings darf der Plasmaspiegel nicht mit dem tatsächlich wirksamen, durch Akkumulation womöglich höheren intrazellulären Metforminspiegel gleichgesetzt werden. Darüber hinaus wurde in den in vitro-Versuchen dieser Arbeit die Kalzifizierung der VSMC zwangsläufig wie im Zeitraffer abgebildet. Die in vivo über Jahre hinweg ablaufenden Prozesse wurden in vitro innerhalb von Tagen nachgestellt. Die nach Literaturrecherche und Dosisfindung höhere Metforminkonzentration von 5 mM kompensierte auch diese zeitliche Diskrepanz und erscheint daher gerechtfertigt.

Durch die Präkonditionierung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin konnte eine Verringerung der VSMC-Kalzifizierung erreicht werden. Im Gegensatz zu Metformin zeigte sich kein signifikanter Effekt bei VSMC, die kein MSC-KM erhielten. Rapamycin verminderte jedoch sowohl die ALP-Aktivität als auch den Calciumgehalt bei gleichzeitiger Behandlung mit MSC-KM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant. Rapamycin steigerte in den durchgeführten Versuchen damit den protektiven Effekt des MSC-Sekretoms. Die eingesetzte Konzentration von 20 nM (=18,28 ng/ml) lag im Bereich der klinisch angestrebten

Konzentrationen und leicht über den empfohlenen Serum-Talspiegeln von 6-14 ng/ml nach Nieren- oder Herztransplantation.<sup>141,142</sup> Sie entsprach den üblicherweise in Zellkulturexperimenten eingesetzten Konzentrationen.<sup>88,143,144</sup>

Im Gegensatz zu Metformin und Rapamycin konnte durch die Behandlung mit 100 nM Insulin keine Verminderung der VSMC-Kalzifizierung beobachtet werden. Sowohl in der ALP-Aktivität als auch im Calciumgehalt der VSMC zeigte sich der deutliche protektive Effekt des MSC-KM. Die Behandlung mit Insulin bewirkte aber weder unter physiologischen noch unter supraphysiologischen Glukosekonzentrationen eine zusätzliche Verminderung der VSMC-Kalzifizierung. Der Effekt des MSC-Sekretoms auf die ALP-Aktivität der kalzifizierenden VSMC wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Insulin im Gegenteil sogar teilweise aufgehoben. Die eingesetzte Insulin-Konzentration von 100 nM lag über den zu messenden Serumspiegeln in Patienten<sup>145</sup>, entsprach jedoch den üblichen in der Zellkultur eingesetzten Konzentrationen.

### 5.3.1 Analyse des mTOR-Netzwerks in MSC: Erhöhte Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase geht mit Protektion durch das MSC-Sekretom einher

---

Nach 1 – 3 Wochen in Kultur wurde in den zur Mediumkonditionierung kultivierten Zellen mittels Western-Blot die Aktivität des mTOR-Netzwerkes untersucht, um mögliche Verbindungen mit den Eigenschaften des MSC-Sekretoms im Hinblick auf die VSMC-Kalzifizierung festzustellen. Im Vergleich zu glatten Gefäßmuskelzellen wiesen MSC die doppelte Menge von pAKT-473 und 50 % mehr pAMPK auf. Phosphoryliertes ribosomales Protein S6 wurde in MSC signifikant weniger als in VSMC nachgewiesen, und zwar um 25 %. Keine signifikanten Unterschiede konnten bei pAKT-308 festgestellt werden. Verglichen mit VSMC spricht dies für eine stärkere basale Aktivität von mTORC2 und von AMPK sowie für eine schwächere Aktivität von mTORC1 in unbehandelten MSC.

Die Präkonditionierung der MSC mit Metformin führte im Vergleich zu unbehandelten MSC zu einer signifikanten Reduktion von 308-phosphorylierter AKT um ca. 25 %. Als Zeichen gesteigerter mTORC2-Aktivierung durch Metformin wurde eine signifikante Zunahme von pAKT-473 um ca. 50 % in MSC gemessen. Keinen signifikanten Einfluss hatte Metformin auf die mTORC1-Aktivität. Die Veränderungen in mit Metformin behandelten MSC unterschieden sich nicht signifikant von denen in VSMC.

Die Behandlung mit der Modells substanz Rapamycin inhibierte sowohl in MSC als auch in VSMC die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 fast vollständig. Rapamycin reduzierte zudem pAKT-473 im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant, in MSC um ca.



85 %, in VSMC um ca. 40 %. Dies entsprach der erwarteten, nahezu vollständigen Inhibition von mTORC1 sowie einer partiellen Inhibition von mTORC2 durch Rapamycin. mTORC2 wurde dabei in MSC signifikant stärker durch Rapamycin blockiert als in VSMC. Die Behandlung mit Rapamycin führte darüber hinaus in MSC zu einer Zunahme der phosphorylierten AMPK um den Faktor 2, die jedoch statistisch nicht signifikant ausfiel.

Die Präkonditionierung mit Insulin führte in MSC zu einer signifikanten Abnahme von pAKT-308. In VSMC hingegen führte die Behandlung mit Insulin zu einer leichten Steigerung von pAKT-308. MSC und VSMC unterschieden sich hinsichtlich dieser Reaktion auf die Langzeitbehandlung mit Insulin signifikant. Die trotz Vorhandensein von Insulin verminderte Aktivierung des Insulin-Signalweges spricht für die Ausbildung einer partiellen Insulinresistenz in MSC.

In den durchgeführten Western-Blot-Analysen fielen die höhere basale Aktivität von mTORC2 und AMPK in MSC verglichen mit VSMC auf. Durch die Behandlung mit Rapamycin wurde die bereits basal höhere AMPK-Aktivität in MSC tendenziell gesteigert, nicht jedoch die Aktivität von mTORC2. Damit einher ging eine verminderte Kalzifizierung der VSMC, die MSC-KM erhielten. Auch unter der Behandlung mit dem AMPK-Aktivator Metformin wurde eine geringere Kalzifizierung der VSMC beobachtet, wenngleich in der Western Blot-Analyse keine signifikante, sondern lediglich eine tendenzielle Zunahme der AMPK-Phosphorylierung um ca. 30 % in MSC nachgewiesen werden konnte. Angesichts der Koinzidenz der protektiven Effekte des MSC-Sekretoms mit einer erhöhten AMPK-Aktivierung bzw. mit der Behandlung mit dem AMPK-Aktivator Metformin erscheint es plausibel, dass die benefiziellen Effekte des MSC-Sekretoms zumindest teilweise durch AMPK reguliert werden.

AMPK fungiert als wichtiger Sensor des intrazellulären Energiestatus.<sup>146</sup> Dieser spiegelt sich in der AMP/ATP-Ratio wider.<sup>86</sup> Eine Energieknappheit und in der Folge hohe AMP-Level aktivieren AMPK.<sup>86</sup> Eine in vitro-Studie mit Atorvastatin zeigte, dass AMPK die Aktivierung der Autophagie und das Überleben von MSC unter hypoxischen Bedingungen vermittelt.<sup>147</sup> Eine andere Studie kam zu dem Schluss, dass das Überleben von MSC unter Hypoxie hingegen unabhängig von der AMPK-Aktivierung ist und dass chronische AMPK-Aktivierung die Proliferation von MSC bremst.<sup>148</sup> Eine intrazelluläre Energieknappheit könnte also MSC dazu anregen, protektiv wirkende Mediatoren zu produzieren und an die Umgebung abzugeben.

Im Einklang mit Gneccchi et al., die zeigten, dass eine Überexpression von AKT in MSC zu vermehrten protektiven Effekten des MSC-Sekretoms auf Kardiomyozyten führt<sup>79</sup>, steht die Beobachtung der basal erhöhten mTORC2-Aktivität in MSC. Die Präkonditionierung mit Rapamycin, durch die die VSMC-Kalzifizierung reduziert wurde, ging jedoch nicht mit einer

erhöhten, sondern sogar mit einer verminderten mTORC2- und AKT-Aktivierung einher. Die in dieser Arbeit beobachteten protektiven Effekte durch das MSC-Sekretom wurden demnach nicht durch mTORC2 und AKT, sondern eher durch AMPK vermittelt.

### 5.3.2 Metformin und Rapamycin schützen durch Aktivierung benefizieller *cell fates*

---

Um der Frage nachzugehen, wie die beobachteten protektiven Effekte durch das MSC-Sekretom und die Behandlung mit Metformin und Rapamycin in den kalzifizierenden VSMC vermittelt wurden, wurden nach 2-wöchiger osteoblastärer Transformation die Zellschicksalsprogramme Apoptose, Autophagie und Seneszenz anhand von Markerproteinen mittels Western Blot in den VSMC untersucht.

Die drei untersuchten Zellschicksale spielen eine wichtige Rolle in der Kalzifizierung von VSMC. Die Apoptose als programmierter Zelltod ist einerseits Konsequenz einer dauerhaften Schädigung, z.B. durch eine Calciumüberladung der VSMC, und treibt andererseits die Kalzifizierung voran.<sup>58</sup> Im Rahmen der Apoptose von VSMC entstehende Apoptosekörperchen können als Nidus die Kalzifizierung in der Gefäßwand auslösen und befördern.<sup>56,58</sup> Bei der Apoptose sind bestimmte Proteasen, sogenannte Caspasen von großer Bedeutung. Die Cleaved caspase 3 dient als guter Marker für die Apoptose. Die Seneszenz bezeichnet im Allgemeinen die Zellalterung und den Verlust der Teilungsfähigkeit.<sup>149</sup> VSMC-Seneszenz kann das Resultat eines natürlichen Alterungsprozesses oder die Folge anhaltender pathologischer Stimuli sein.<sup>149</sup> Insbesondere diese letztere, frühzeitige Seneszenz ist in der Entstehung der Mediasklerose zu beobachten.<sup>35</sup> Autophagie lässt sich am ehesten als Selbstverdauung der Zelle beschreiben, sowohl um im Falle von Energieknappheit Energie zu gewinnen als auch um nicht mehr benötigte oder durch strukturelle Modifikation dysfunktional gewordene Zellproteine, die durch Akkumulation zellschädigend wirken, abzubauen.<sup>150</sup> Mangelhafte Autophagie kann ihrerseits zu Apoptose oder Zellseneszenz führen. Sie ist von großer Bedeutung bei der Entstehung von Gefäßerkrankungen, insbesondere der Mediasklerose.<sup>150</sup> Dai et al. konnten zeigen, dass Autophagie als adaptiver Mechanismus in VSMC vor Kalzifizierung schützen kann.<sup>41,42</sup> Wie Grootaert et al. zeigten, führt eine Störung der Autophagie zur vorzeitigen Alterung von VSMC und zu ungünstigen phänotypischen Veränderungen.<sup>151</sup> Zur Abschätzung der zellulären Autophagie wurde in der vorliegenden Arbeit das Mikrotubulus-assoziierte Leichtketten-Protein LC3B untersucht. Anhand des im Rahmen der Autophagie entstehenden LC3-II kann die zelluläre Autophagie quantifiziert werden.<sup>152</sup> Da LC3-II Bestandteil von Autophagosomen ist, zeigt sein vermehrtes Vorkommen eine höhere Anzahl von Autophagosomen an. Ob dies jedoch durch eine vermehrte Bildung, also einer Steigerung der Autophagie, oder einen

verminderten Abbau, wie er bei Hemmung des Autophagie-Fluxes vorkommt, bedingt ist, kann durch alleinige Messung von LC3-II nicht festgestellt werden. Dazu wäre eine Messung des Autophagie-Fluxes erforderlich.<sup>152</sup>

Die Behandlung mit MSC-KM führte in der vorliegenden Arbeit nicht zu wesentlichen Veränderungen bei den Markern für Apoptose, Seneszenz oder Autophagie in den kalzifizierenden VSMC. Insbesondere konnten keine verminderte Apoptose oder Seneszenz und keine vermehrte Autophagie beobachtet werden. Entgegen den Erwartungen wiesen mit MSC-KM behandelte Zellen sogar mehr Cleaved caspase 3 als Apoptosemarker als die Kontrollen auf. Die protektive Wirkung des MSC-Sekretoms spiegelte sich also nicht in den untersuchten Zellschicksalsmarkern wider.

Metformin und Rapamycin reduzierten die Apoptose in kalzifizierenden VSMC, die kein MSC-KM erhielten. Rapamycin verringerte zudem die Seneszenz in den kalzifizierenden VSMC, und zwar unabhängig von der Behandlung mit MSC-KM. Anders als das MSC-Sekretoms wirkten sich Metformin und Rapamycin damit günstig auf die untersuchten Zellschicksals-Marker aus. Mit Insulin behandelte VSMC zeigten verstärkte Apoptose und Seneszenz sowie Hinweise für vermehrte Autophagie.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die protektive Wirkung des MSC-Sekretoms auf andere Art vermittelt wird als die Wirkung von Metformin bzw. Rapamycin. Dies spricht eher für einen additiven Zusatznutzen durch die gleichzeitige Behandlung der VSMC mit Metformin bzw. Rapamycin als für zusätzliche Protektion durch eine Modulation des MSC-Sekretoms. Da dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde, lassen sich jedoch aus den Ergebnissen lediglich Vermutungen und keine durch statistische Signifikanz untermauerten Aussagen ableiten. Insbesondere die unter MSC-KM beobachtete vermehrte Apoptose der kalzifizierenden VSMC ist mit Vorsicht zu betrachten. Ferner müsste zur Quantifizierung der Autophagie in weiteren Versuchen auch der *Autophagic Flux* bestimmt werden.

## 5.4 Limitationen der Arbeit

---

### 5.4.1 Limitationen des in vitro-Modells

---

Das verwendete in vitro-Modell, das die Pathogenese der Mediasklerose auf die osteoblastäre Transformation von VSMC reduzierte, stellte eine starke Vereinfachung der in vivo ablaufenden Prozesse dar und wies gewisse Limitationen auf. Einerseits ermöglichte die Vereinfachung Untersuchungen genau dieses zentralen Prozesses. Andererseits wurden die Interaktion zwischen VSMC und anderen Zellen sowie das proinflammatorische Milieu bei Diabetes mellitus und

CKD außer Acht gelassen. Auch stellte, wie unter 5.1 diskutiert, die alleinige Veränderung der Glukosekonzentration im Medium kein hinreichendes Modell für Diabetes mellitus dar. Dennoch war das gewählte in vitro-Modell für die ersten Untersuchungen zur Verwendung des MSC-Sekretoms bei Mediasklerose sicherlich geeignet.

Um den Effekt des MSC-Sekretoms zu untersuchen, wurde MSC-KM auf kalzifizierende VSMC übertragen. Es stellt sich die Frage, ob die beobachtete Wirkung des MSC-KM mit dem MSC-Sekretom gleichgesetzt werden darf. Als Kontrolle zu MSC-KM wurde von VSMC konditioniertes Medium verwendet. Zwar produzieren auch VSMC parakrine Mediatoren, z.B. Adiponectin, und beeinflussen sich dadurch gegenseitig, insbesondere auch den VSMC-Phänotyp<sup>153</sup>, jedoch lassen sich in der Literatur keine Beschreibungen eines komplexen VSMC-Sekretoms finden. Da als Kontrolle konditioniertes Medium von VSMC auf kalzifizierende VSMC-Zielzellen übertragen wurde, kann zudem davon ausgegangen werden, dass mit der Mediumübertragung keine Mediatoren übertragen wurden, die nicht ohnehin auch von den kalzifizierenden VSMC-Zielzellen produziert wurden. Von VSMC konditioniertes Medium erschien unter diesen Aspekten als eine geeignete Kontrolle.

Eine mögliche Alternative wäre, wie in anderen Arbeiten und z.B. von Ando et al. als Kontrolle verwendet, natives Kulturmedium gewesen.<sup>128</sup> In diesem Fall hätte das Kontrollmedium sicherlich keine von Zellen sezernierten Faktoren enthalten. Andererseits wäre das Kontrollmedium ein komplett unverbrauchtes Medium gewesen, während dem MSC-KM durch den Stoffwechsel der MSC zumindest ein Teil der Nährstoffe entzogen worden war. Diese Unterschiede hätten wiederum Einfluss auf den Kalzifizierungsprozess der VSMC ausüben können.

#### 5.4.2 Pharmakologische Beeinflussung: Additive Effekte vs. Sekretom-Modulation

---

Um die Zusammensetzung des MSC-Sekretoms zu modulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Ansatz der pharmakologischen Präkonditionierung verfolgt: Die zur Mediumkonditionierung kultivierten Zellen erhielten 5 mM Metformin, 100 nM Insulin oder 20 nM Rapamycin. Da die eingesetzten Pharmaka vor der Mediumübertragung nicht selektiv aus dem Kulturmedium entfernt werden konnten, erhielten auch die kalzifizierenden VSMC das jeweils eingesetzte Pharmakon. Das im Verhältnis 1:1 mit zweifach konzentriertem Osteoblastenmedium versetzte konditionierte Medium wurde mit dem entsprechenden Pharmakon angereichert, sodass die Ausgangskonzentration wiederhergestellt und konstante Konzentrationen gewährleistet wurden.

Die verwendeten Pharmaka wirkten also nicht ausschließlich auf die mediumkonditionierenden Zellen und modulierten das MSC-Sekretom, sondern wirkten auch in den kalzifizierenden VSMC-Zielzellen selbst. Es ergibt sich daraus die Frage, ob die beobachteten Veränderungen im Kalzifizierungsprozess durch das modulierte MSC-Sekretom oder die direkte Einwirkung der Pharmaka zu erklären sind.

#### *5.4.2.1 Metformin: Zusätzliche Protektion durch additive Effekte*

---

Metformin reduzierte den Calciumgehalt der VSMC unter supraphysiologischen Glukosekonzentrationen von 450 mg/dL im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle signifikant, und zwar um je ca. 25 % (siehe Abbildung 18). Dieser protektive Effekt durch die Behandlung mit Metformin zeigte sich bei kalzifizierenden VSMC unabhängig davon, ob sie MSC-KM oder Kontroll-Medium erhielten. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Wirkung von Metformin nicht allein durch eine Modulation des MSC-Sekretoms zu erklären ist. Die Analyse der Zellschicksalsprogramme in den kalzifizierenden VSMC zeigte, dass Metformin anders als das MSC-Sekretom und unabhängig von der Behandlung mit MSC-KM antiapoptotisch auf kalzifizierende VSMC wirkte. Auch diese unterschiedlichen Wirkmechanismen von MSC-Sekretom und Metformin, die sich in der Analyse der Zellschicksalsprogramme widerspiegeln, sprechen dafür, dass die zusätzliche Protektion durch Metformin eher durch additive Effekte als durch eine reine Modulation des MSC-Sekretoms zu erklären ist.

Schon seit längerem ist aus klinischen Studien bekannt, dass Metformin das kardiovaskuläre Risiko bei Typ 2 Diabetikern senkt.<sup>96,97</sup> Die verminderte Entstehung von Atherosklerose und Mediasklerose unter Metformin wird zumeist durch eine AMPK-abhängige Verbesserung der endothelialen Funktion erklärt.<sup>100,154</sup> Für das in dieser Arbeit verwendete Modell einer reinen VSMC-Kultur muss jedoch nach anderen Erklärungsansätzen gesucht werden. Ob Metformin einen direkten Einfluss auf die osteoblastäre Transdifferenzierung von VSMC ausübt, ist nach derzeitigem Stand der Forschung nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Metformin die Differenzierung von Osteoblasten inhibieren kann.<sup>91</sup> Außerdem ist bekannt, dass Metformin die Zellalterung verlangsamt<sup>155</sup> und die zelluläre Autophagie fördert<sup>146</sup>, beides mögliche Erklärungen für eine anti-kalzifizierende Wirkung von Metformin.<sup>42</sup> In dieser Arbeit wurden lediglich eine Verminderung der Apoptose, nicht jedoch eine Verminderung der Seneszenz oder eine Steigerung der Autophagie unter Metformin nachgewiesen. Dennoch erscheint eine Kombination aus direkter Inhibierung der osteoblastären Differenzierung bei gleichzeitiger Verlangsamung der VSMC-Alterung und Förderung der Autophagie als möglicher Erklärungsansatz für die protektive Wirkung von Metformin.

#### 5.4.2.2 *Insulin: Verstärkte VSMC-Seneszenz*

---

Insulin übte keinen zusätzlichen protektiven Effekt auf die kalzifizierenden VSMC aus. Im Gegenteil führte die zusätzliche Behandlung mit Insulin bei VSMC, die MSC-KM erhielten, unter supraphysiologischen Glukosekonzentrationen zu einem leichten Anstieg der ALP-Aktivität nach 7 Tagen in Kultur.

Der Einfluss von Insulin auf die Entstehung von Atherosklerose und Mediasklerose wird kontrovers diskutiert.<sup>156</sup> Während einige Autoren Insulin selbst eine proatherogene Wirkung zuschreiben, halten andere die periphere Insulinresistenz für das eigentliche Problem.<sup>156</sup> Wang et al. zeigten in vitro, dass Insulin die Kalzifizierung von VSMC vermindert und dass dieser Effekt durch eine Blockade des PI3K-Signalweges aufgehoben wird.<sup>157</sup> Yuan et al. hingegen zeigten, dass Insulin die osteoblastäre Differenzierung von VSMC PI3K-unabhängig fördert.<sup>102</sup> Auch Davenport et al. wiesen nach, dass Insulin die VSMC-Kalzifizierung verstärkt, und zwar durch die verminderte Expression von Osteoprotegrin.<sup>103</sup> Interessant sind zudem Ergebnisse von Harith et al., wonach Insulin die Proliferation und die Apoptose von VSMC fördert.<sup>158</sup>

In der vorliegenden Arbeit konnte kein wesentlicher Effekt von Insulin auf die VSMC-Kalzifizierung nachgewiesen werden. In der Analyse der Zellschicksalsprogramme wiesen kalzifizierende VSMC, die mit Insulin behandelt wurden, nach 2-wöchiger Kultur jedoch einen mehr als 3-fach erhöhten Apoptosemarker und einen 1,5-2-fach erhöhten Seneszenzmarker auf. Diese ungünstige Beeinflussung der Zellschicksalsprogramme ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Harith et al. am ehesten direkt der Insulin-Behandlung und nicht einer Modulation des MSC-Sekretoms zuzuschreiben.

#### 5.4.2.3 *Rapamycin: Protektion durch Modulation des MSC-Sekretoms und additive Effekte*

---

Rapamycin bewirkte ähnlich wie Metformin eine Reduktion der VSMC-Kalzifizierung. Dies zeigte sich sowohl unter physiologischen als auch unter supraphysiologischen Glukosekonzentrationen in einer verminderten ALP-Aktivität und einem geringeren Calciumgehalt. Wenngleich ein Trend zu geringerer Kalzifizierung durch Rapamycin auch bei VSMC zu erkennen war, die Kontrollmedium erhielten, führte Rapamycin – anders als Metformin – nur in VSMC, die MSC-KM erhielten, zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Calciumgehaltes.

Die Behandlung mit Rapamycin führte in MSC neben einer Inhibierung von mTORC1 und mTORC2 zu einer tendenziellen Aktivitätssteigerung der AMPK um den Faktor 2. Die Inhibierung von mTOR und die gleichzeitige Aktivierung der AMPK erscheinen somit als günstig für die Zusammensetzung des MSC-Sekretoms. Die zusätzliche Protektion durch

Rapamycin könnte sich zumindest teilweise als Erfolg der Präkonditionierung der MSC erklären lassen.

Die Analyse der Zellschicksalsprogramme ergab eine deutliche Reduktion des Apoptosemarkers Cleaved caspase 3 durch Rapamycin in VSMC, die kein MSC-KM erhielten. Außerdem führte Rapamycin ohne MSC-KM zu einer geringen Reduktion des Seneszenzmarkers p16 in kalzifizierenden VSMC. Überraschenderweise wurde LC3-II als Marker für die zelluläre Autophagie durch Rapamycin in dieser Arbeit nicht beeinflusst (siehe Abbildung 27). Um den zu erwartenden stimulierenden Effekt von Rapamycin auf die Autophagie zu untersuchen, sollte in weiterführenden Versuchen auch der *Autophagic Flux* gemessen werden.

Auch andere Arbeiten konnten einen Einfluss von Rapamycin auf die Zellschicksalsprogramme nachweisen. Es ist bekannt, dass Rapamycin durch die direkte Inhibierung von mTORC1 und die indirekte Inhibierung von mTORC2 die Autophagie fördert und Apoptose sowie Zellseneszenz reduziert.<sup>155,159</sup> Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Wirkung von MSC-Sekretom und Rapamycin auf die Zellschicksalsprogramme unterschieden sich deutlich. Die unter Rapamycin beobachteten protektiv wirkende Beeinflussung der Zellschicksalsprogramme wurde durch die gleichzeitige Behandlung mit MSC-KM aufgehoben. Es muss daher vermutet werden, dass neben der beschriebenen günstigen Beeinflussung des MSC-Sekretoms auch Sekretom-unabhängige Mechanismen und damit additive Effekte für die zusätzliche anti-kalzifizierende Wirkung durch Rapamycin verantwortlich sind.

Mögliche Erklärungsansätze, wie Rapamycin die osteoblastäre Transformation von VSMC direkt beeinflusst haben könnte, bieten die Ergebnisse anderer Autoren. So zeigten Zhao et al. am Rattenmodell mit CKD, dass Rapamycin die Entstehung der Mediasklerose bremste und die osteoblastäre Differenzierung von VSMC verhinderte.<sup>92</sup> Auch ex vivo reduzierte Rapamycin in Aortagewebe die Kalzifizierung.<sup>92</sup> Die Autoren identifizierten Klotho, ein dem Alterungsprozess entgegenwirkendes Proteohormon mit multiplen Funktionen, u.a. im Calcium-Phosphat-Haushalt, als Mediator der anti-kalzifizierenden Wirkung von Rapamycin.<sup>92</sup> Darüber hinaus ist bekannt, dass das mTOR-Netzwerk für die Regulation des VSMC-Phänotyps maßgeblich ist.<sup>160</sup> Wie Hegner et al. zeigten, stabilisiert Rapamycin durch die mTOR-Blockade den kontraktilen Phänotyp von VSMC und lässt MSC als mögliche Vorläufer zu VSMC differenzieren.<sup>108</sup> Auch andere Autoren zeigten, dass eine mTORC1-Inhibierung, z.B. durch Rapamycin, die VSMC-Differenzierung und den kontraktilen Phänotyp fördert.<sup>160,161</sup>

### 5.4.3 Der Problemfall Metformin in der Zellkultur

---

Metformin interferierte mit der Proteinbestimmung nach Lowry. Bei Verwendung des standardmäßig eingesetzten DCTM Protein Assays der Firma Biorad färbten sich metforminhaltige Proben dosisabhängig blau, was eine Ermittlung des Proteingehaltes in diesen Proben unmöglich machte. Die Testung weiterer Nachweisverfahren zur Proteinbestimmung (Massenspektrometrie, Proteinbestimmung nach Bradford) verlief erfolglos.

Es musste daher in Experimenten mit Metformin auf eine Quantifizierung des Proteingehaltes verzichtet werden. Stattdessen wurden die ALP-Aktivität und der Calciumgehalt auf das Probenvolumen bezogen. Bei Western Blot-Analysen mit metforminhaltigen Proben wurden die gemessenen Signale ohne vorherige Normierung des Proteingehalts auf eine Ladekontrolle bezogen. Die entstehenden Ungenauigkeiten wurden minimiert, indem vor der Durchführung von Messungen auf eine ähnliche Zelldichte in den untersuchten Zellkulturschalen bzw. Löchern geachtet wurde.

Da ein Einfluss von Metformin auf die Proliferation und damit auf die Dichte der kalzifizierenden VSMC nicht ausgeschlossen werden kann, sind die Ergebnisse zu Versuchen mit Metformin unter Vorbehalt zu betrachten.

## 5.5 Ausblick

---

### 5.5.1 Erweiterungen des Modells

---

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MSC einen protektiven Effekt auf die Kalzifizierung von VSMC ausüben können. In Studien zu zellhaltigen Therapien sind die beobachteten Effekte schwierig zuzuordnen: Stets stellt sich die Frage, ob transplantierte MSC durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder parakrine Sekretion wirken oder selbst differenzieren. Durch die ausschließliche Übertragung von konditioniertem Medium in den Versuchen dieser Arbeit konnten die beobachteten Effekte eindeutig dem MSC-Sekretom zugeschrieben werden. Damit eröffnet sich ein interessanter, neuartiger Ansatz zur Prävention und Behandlung der Mediasklerose.

Durch die gleichzeitige Behandlung mit Metformin bzw. Rapamycin konnte der protektive Effekt des MSC-Sekretoms gesteigert werden. Insbesondere bei Rapamycin ist dafür auch die Modulation des MSC-Sekretoms verantwortlich zu machen. Es liegt nahe, die Wirkung anderer Präkonditionierungsstrategien auf das MSC-Sekretom zu untersuchen. Dazu zählen die Kultivierung von MSC unter hypoxischen Bedingungen und unter Serumentzug.<sup>76</sup> Diese Methoden hätten zudem den Vorteil, dass die Präkonditionierung selbst nicht mit der



Kalzifizierung der VSMC interferieren würde. Eine Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen würde, ähnlich wie pharmakologisch durch Metformin induziert, zu intrazellulär sinkenden ATP-Spiegeln und zu Energieknappheit führen. Serumentzug würde die mTOR-Aktivität reduzieren. Auch die Strategie der genetischen Modifikation könnte verfolgt werden. Die Western-Blot-Analysen dieser Arbeit deckten auf, dass die protektive Wirkung des MSC-Sekretoms mit einer hohen Aktivität der AMPK einherging. Es wäre daher von Interesse, die Wirkung des Sekretoms von AMPK-überexprimierenden MSC auf die Kalzifizierung von VSMC zu untersuchen.

Auf dem Weg zur klinischen Nutzbarmachung des MSC-Sekretoms zur Behandlung der Mediasklerose sind auch Versuche am Tiermodell nötig. Einige Arbeitsgruppen haben bereits die lokale Wirkung von MSC-KM *in vivo* untersucht.<sup>79,80,128</sup> Im diabetischen bzw. CKD-Tiermodell könnte die Wirkung von systemisch appliziertem MSC-KM auf die Entstehung der Mediasklerose untersucht werden. Um die Volumenbelastung gering zu halten, könnte wie von Gnechi et al. beschrieben durch Ultrafiltration ein Konzentrat des konditionierten Mediums gewonnen werden.<sup>79</sup>

### 5.5.2 From Bench to Bedside: Sekretom vs. einzelne Faktoren

---

Nach wie vor birgt das MSC-Sekretom viele Geheimnisse und es ist unklar, welche der sezernierten Faktoren für seine protektiven Wirkungen verantwortlich sind. Es war nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Faktoren zu identifizieren. Jedoch zeigte die Suche nach Erklärungsansätzen und die Diskussion möglicher Wirkungsweisen, dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht. Insbesondere wäre es von Interesse, die Rolle der Exosomen und der miRNA in der Wirkung des MSC-Sekretoms auf die VSMC-Kalzifizierung zu untersuchen. Dazu könnten z.B. Exosomen aus MSC-KM durch sequentielle Zentrifugation isoliert und deren Wirkung auf den Kalzifizierungsprozess untersucht werden.<sup>162</sup> MSC-KM könnte außerdem gezielt auf bestimmte miRNA hin untersucht werden, denen eine Funktion in der Entstehung der Mediasklerose bzw. in der Regulation des VSMC-Phänotyps zugeschrieben wird: miRNA-21, miRNA-143, miRNA-145, mi-RNA148 sowie miRNA-204.<sup>136,137</sup> Andererseits sollte durch gezielte Behandlung von VSMC mit ebendiesen miRNA deren Funktion in der VSMC-Kalzifizierung bestätigt werden.

Nicht alle von MSC sezernierten Faktoren üben zwangsläufig eine gewünschte Wirkung aus, so z.B. IL-6 als proinflammatorisches Zytokin.<sup>76,123</sup> Erstrebenswert wäre daher die Identifikation einzelner oder mehrerer anti-kalzifizierender Faktoren des MSC-Sekretoms. Diese könnten ex

vivo rekombinant oder synthetisch hergestellt werden und als Pharmaka gezielt appliziert werden.

Sollte die Identifikation einzelner Mediatoren nicht gelingen, bietet sich die systemische Applikation von konzentriertem MSC-KM. Als Alternative erscheint die Konditionierung des Plasmas bzw. des Patientenblutes selbst durch MSC. In Anbetracht der Häufigkeit arteriosklerotischer Komplikationen bei Patienten mit diabetischer Nephropathie oder ESRD im Allgemeinen wären MSC-haltige Dialysatoren denkbar, in denen MSC ihr Sekretom direkt in das Patientenblut abgeben.

Dies, aber auch die mögliche Behandlung mit isolierten anti-kalzifizierenden Mediatoren des MSC-Sekretoms, birgt die Möglichkeit der zielgerichteten Behandlung von Patientengruppen mit hohem Risiko für die Entwicklung arteriosklerotischer Komplikationen.

## 6 Literaturverzeichnis

---

- (1) Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2095-128.
- (2) Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe - epidemiological update 2015. *Eur Heart J* 2015;36:2696-705.
- (3) Livingstone SJ, Looker HC, Hothersall EJ, Wild SH, Lindsay RS, Chalmers J, Cleland S, Leese GP, McKnight J, Morris AD, Pearson DW, Peden NR, Petrie JR, Philip S, Sattar N, Sullivan F, Colhoun HM. Risk of cardiovascular disease and total mortality in adults with type 1 diabetes: Scottish registry linkage study. *PLoS Med* 2012;9:e1001321.
- (4) Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:229-34.
- (5) Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, McAlister F, Garg AX. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2034-47.
- (6) Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J, Collaboration ERF. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010;375:2215-22.
- (7) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
- (8) Lachin JM, Orchard TJ, Nathan DM, Group DER. Update on cardiovascular outcomes at 30 years of the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care* 2014;37:39-43.
- (9) Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT, Group AtCCRI DS. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2545-59.
- (10) Gerstein HC, Miller ME, Genuth S, Ismail-Beigi F, Buse JB, Goff DC, Probstfield JL, Cushman WC, Ginsberg HN, Bigger JT, Grimm RH, Byington RP, Rosenberg YD, Friedewald WT, Group AS. Long-term effects of intensive glucose lowering on cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2011;364:818-28.
- (11) Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2560-72.
- (12) Boussageon R, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, Lafont S, Bergeonneau C, Kassai B, Erpeldinger S, Wright JM, Gueyffier F, Cornu C. Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2011;343:d4169.
- (13) Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1577-89.
- (14) Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 2007;116:85-97.
- (15) Rennenberg RJ, Kessels AG, Schurgers LJ, van Engelshoven JM, de Leeuw PW, Kroon AA. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5:185-97.

- (16) Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J* 2014;35:1515-25.
- (17) Maahs DM, Jalal D, Chonchol M, Johnson RJ, Rewers M, Snell-Bergeon JK. Impaired renal function further increases odds of 6-year coronary artery calcification progression in adults with type 1 diabetes: the CACTI study. *Diabetes Care* 2013;36:2607-14.
- (18) Allison SJ. Cardiovascular disease: progression of coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes mellitus with and without kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:494.
- (19) Preiss D, Sattar N, McMurray JJ. A systematic review of event rates in clinical trials in diabetes mellitus: the importance of quantifying baseline cardiovascular disease history and proteinuria and implications for clinical trial design. *Am Heart J* 2011;161:210-9.e1.
- (20) Fishbein MC, Fishbein GA. Arteriosclerosis: facts and fancy. *Cardiovasc Pathol* 2015;24:335-42.
- (21) Fishbein GA, Fishbein MC. Arteriosclerosis: rethinking the current classification. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1309-16.
- (22) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- (23) Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:724-36.
- (24) Mönckeberg J. Über die reine Mediaverkalkung und ihr Verhalten zur Arteriosklerose.: *Virchows Archiv*; 1902:141-67.
- (25) Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Rönkämaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:978-83.
- (26) Blacher J, Guérin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001;38:938-42.
- (27) London GM, Guérin AP, Marchais SJ, Métivier F, Pannier B, Adda H. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1731-40.
- (28) Schlieper G, Schurgers L, Brandenburg V, Reutelingsperger C, Floege J. Vascular calcification in chronic kidney disease: an update. *Nephrol Dial Transplant* 2015.
- (29) Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013;34:2436-43.
- (30) Abou-Hassan N, Tantisattamo E, D'Orsi ET, O'Neill WC. The clinical significance of medial arterial calcification in end-stage renal disease in women. *Kidney Int* 2015;87:195-9.
- (31) Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1318-27.
- (32) Thompson B, Towler DA. Arterial calcification and bone physiology: role of the bone-vascular axis. *Nat Rev Endocrinol* 2012;8:529-43.
- (33) Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999;100:2168-76.
- (34) Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2857-67.
- (35) Shanahan CM. Mechanisms of vascular calcification in CKD-evidence for premature ageing? *Nat Rev Nephrol* 2013;9:661-70.
- (36) Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 2011;108:1494-509.
- (37) Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2920-30.
- (38) Kapustin AN, Shanahan CM. Calcium regulation of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles. *Trends Cardiovasc Med* 2012;22:133-7.
- (39) O'Neill WC. Pyrophosphate, alkaline phosphatase, and vascular calcification. *Circ Res* 2006;99:e2.

- (40) Villa-Bellosta R, Wang X, Millán JL, Dubyak GR, O'Neill WC. Extracellular pyrophosphate metabolism and calcification in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301:H61-8.
- (41) Shanahan CM. Autophagy and matrix vesicles: new partners in vascular calcification. *Kidney Int* 2013;83:984-6.
- (42) Dai XY, Zhao MM, Cai Y, Guan QC, Zhao Y, Guan Y, Kong W, Zhu WG, Xu MJ, Wang X. Phosphate-induced autophagy counteracts vascular calcification by reducing matrix vesicle release. *Kidney Int* 2013;83:1042-51.
- (43) Iyemere VP, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* 2006;260:192-210.
- (44) Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:E14-22.
- (45) Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.
- (46) Yamada S, Taniguchi M, Tokumoto M, Toyonaga J, Fujisaki K, Suehiro T, Noguchi H, Iida M, Tsuruya K, Kitazono T. The antioxidant tempol ameliorates arterial medial calcification in uremic rats: important role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* 2012;27:474-85.
- (47) Leopold JA. Vascular calcification: Mechanisms of vascular smooth muscle cell calcification. *Trends Cardiovasc Med* 2015;25:267-74.
- (48) Ketteler M, Elder GJ, Evenepoel P, Ix JH, Jamal SA, Lafage-Proust MH, Shroff R, Thadhani RI, Tonelli MA, Kasiske BL, Wheeler DC, Leonard MB. Revisiting KDIGO clinical practice guideline on chronic kidney disease-mineral and bone disorder: a commentary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes controversies conference. *Kidney Int* 2015;87:502-28.
- (49) Boström KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res* 2011;109:564-77.
- (50) Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:489-94.
- (51) Sun Y, Byon CH, Yuan K, Chen J, Mao X, Heath JM, Javed A, Zhang K, Anderson PG, Chen Y. Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ Res* 2012;111:543-52.
- (52) Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 2008;283:15319-27.
- (53) Liu Y, Shanahan CM. Signalling pathways and vascular calcification. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2011;16:1302-14.
- (54) Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:715-23.
- (55) Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circ Res* 2011;109:697-711.
- (56) Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000;87:1055-62.
- (57) Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM, Proudfoot D. Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res* 2008;103:e28-34.
- (58) Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, Hiorns M, Donald AE, Deanfield J, Rees L, Shanahan CM. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* 2008;118:1748-57.
- (59) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.

- (60) da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-13.
- (61) Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008;2:313-9.
- (62) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
- (63) Galderisi U, Giordano A. The gap between the physiological and therapeutic roles of mesenchymal stem cells. *Med Res Rev* 2014;34:1100-26.
- (64) Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301-13.
- (65) Naik V, Leaf EM, Hu JH, Yang HY, Nguyen NB, Giachelli CM, Speer MY. Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an in vivo genetic fate mapping study. *Cardiovasc Res* 2012;94:545-54.
- (66) Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Boström K, Demer LL. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003;108:2505-10.
- (67) Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* 2015.
- (68) Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499-506.
- (69) Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726-36.
- (70) von Dalowski F, Kramer M, Wermke M, Wehner R, Röllig C, Alakel N, Stölzel F, Parmentier S, Sockel K, Krech M, Schmitz M, Platzbecker U, Schetelig J, Bornhäuser M, von Bonin M. Mesenchymal Stromal Cells for Treatment of Acute Steroid-Refractory GvHD: Clinical Responses and Long-Term Outcome. *Stem Cells* 2015.
- (71) Munneke JM, Spruit MJ, Cornelissen AS, van Hoeven V, Voermans C, Hazenberg MD. The Potential of Mesenchymal Stromal Cells as Treatment for Severe Steroid-Refractory Acute Graft-Versus-Host Disease: A Critical Review of the Literature. *Transplantation* 2015.
- (72) Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104:3581-7.
- (73) Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-5.
- (74) Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Gherlin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012;308:2369-79.
- (75) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009;5:54-63.
- (76) Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012;10:244-58.
- (77) Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int* 2013;2013:130763.
- (78) Leiker M, Suzuki G, Iyer VS, Canty JM, Lee T. Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2008;17:911-22.
- (79) Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005;11:367-8.

- (80) Timmers L, Lim SK, Hofer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, Piek JJ, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res* 2011;6:206-14.
- (81) Bartunek J, Croissant JD, Wijns W, Gofflot S, de Lavareille A, Vanderheyden M, Kaluzhny Y, Mazouz N, Willemsen P, Penicka M, Mathieu M, Homsy C, De Bruyne B, McEntee K, Lee IW, Heyndrickx GR. Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1095-104.
- (82) Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2009;122:3589-94.
- (83) Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 2013;126:1713-9.
- (84) Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* 2015;25:545-55.
- (85) Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 2007;9:316-23.
- (86) Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008;30:214-26.
- (87) Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol* 2014;36:79-90.
- (88) Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, R  egg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004;6:1122-8.
- (89) Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. *Dev Cell* 2007;12:487-502.
- (90) Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-93.
- (91) Kasai T, Bandow K, Suzuki H, Chiba N, Kakimoto K, Ohnishi T, Kawamoto S, Nagaoka E, Matsuguchi T. Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity. *J Cell Physiol* 2009;221:740-9.
- (92) Zhao Y, Zhao MM, Cai Y, Zheng MF, Sun WL, Zhang SY, Kong W, Gu J, Wang X, Xu MJ. Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation. *Kidney Int* 2015;88:711-21.
- (93) Heath J, Sun Y, Yuan K, Bradley WE, Litovsky S, Dell'italia LJ, Chatham JC, Wu H, Chen Y. Activation of AKT by O-GlcNAcylation Induces Vascular Calcification in Diabetes. *Circ Res* 2014.
- (94) Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:21-35.
- (95) Pernicova I, Korbonits M. Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2014.
- (96) Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998;352:854-65.
- (97) Selvin E, Bolen S, Yeh HC, Wiley C, Wilson LM, Marinopoulos SS, Feldman L, Vassy J, Wilson R, Bass EB, Brancati FL. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Arch Intern Med* 2008;168:2070-80.
- (98) Whittington HJ, Hall AR, McLaughlin CP, Hausenloy DJ, Yellon DM, Mocanu MM. Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc Drugs Ther* 2013;27:5-16.
- (99) Forouzanmehr F, Salazar G, Patrushev N, Xiong S, Hilenski L, Fei B, Alexander RW. Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e001202.
- (100) Cao X, Li H, Tao H, Wu N, Yu L, Zhang D, Lu X, Zhu J, Lu Z, Zhu Q. Metformin inhibits vascular calcification in female rat aortic smooth muscle cells via the AMPK-eNOS-NO pathway. *Endocrinology* 2013;154:3680-9.
- (101) Yu Q, Gao F, Ma XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2011;89:516-24.

- (102) Yuan LQ, Zhu JH, Wang HW, Liang QH, Xie H, Wu XP, Zhou H, Cui RR, Sheng ZF, Zhou HD, Zhu X, Liu GY, Liu YS, Liao EY. RANKL is a downstream mediator for insulin-induced osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *PLoS One* 2011;6:e29037.
- (103) Davenport C, Mahmood WA, Forde H, Ashley DT, Agha A, McDermott J, Sreenan S, Thompson CJ, McGrath F, McAdam B, Cummins PM, Smith D. The effects of insulin and liraglutide on osteoprotegerin and vascular calcification in vitro and in patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2015;173:53-61.
- (104) Polak P, Hall MN. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:209-18.
- (105) Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006;22:159-68.
- (106) Vergès B, Cariou B. mTOR inhibitors and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2015.
- (107) Singha UK, Jiang Y, Yu S, Luo M, Lu Y, Zhang J, Xiao G. Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2008;103:434-46.
- (108) Hegner B, Lange M, Kusch A, Essin K, Sezer O, Schulze-Lohoff E, Luft FC, Gollasch M, Dragun D. mTOR regulates vascular smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:232-8.
- (109) Chen J, Crawford R, Chen C, Xiao Y. The Key Regulatory Roles of the PI3K/Akt Signaling Pathway in the Functionalities of Mesenchymal Stem Cells and Applications in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2013;19:516-28.
- (110) Huang J, Guo J, Beigi F, Hodgkinson CP, Facundo HT, Zhang Z, Espinoza-Derout J, Zhou X, Pratt RE, Mirotsoy M, Dzau VJ. HASF is a stem cell paracrine factor that activates PKC epsilon mediated cytoprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2014;66:157-64.
- (111) Kim J, Shapiro L, Flynn A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 2015;151:8-15.
- (112) Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine 2007.
- (113) Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295-312.
- (114) Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 2007;8:70.
- (115) Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater* 2011;7:463-77.
- (116) LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- (117) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- (118) Zhuang Y, Chan DK, Haugrud AB, Miskimins WK. Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. *PLoS One* 2014;9:e108444.
- (119) Salani B, Marini C, Rio AD, Ravera S, Massollo M, Orengo AM, Amaro A, Passalacqua M, Maffioli S, Pfeffer U, Cordera R, Maggi D, Sambuceti G. Metformin impairs glucose consumption and survival in Calu-1 cells by direct inhibition of hexokinase-II. *Sci Rep* 2013;3:2070.
- (120) Karnevi E, Said K, Andersson R, Rosendahl AH. Metformin-mediated growth inhibition involves suppression of the IGF-I receptor signalling pathway in human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 2013;13:235.
- (121) Taylor KS, Heneghan CJ, Farmer AJ, Fuller AM, Adler AI, Aronson JK, Stevens RJ. All-cause and cardiovascular mortality in middle-aged people with type 2 diabetes compared with people without diabetes in a large U.K. primary care database. *Diabetes Care* 2013;36:2366-71.
- (122) Geraldès P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 2010;106:1319-31.
- (123) Park CW, Kim KS, Bae S, Son HK, Myung PK, Hong HJ, Kim H. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells* 2009;2:59-68.



- (124) Sun J, Zhou H, Deng Y, Zhang Y, Gu P, Ge S, Fan X. Conditioned medium from bone marrow mesenchymal stem cells transiently retards osteoblast differentiation by downregulating runx2. *Cells Tissues Organs* 2012;196:510-22.
- (125) Alves RD, Eijken M, van de Peppel J, van Leeuwen JP. Calcifying vascular smooth muscle cells and osteoblasts: independent cell types exhibiting extracellular matrix and biomineralization-related mimicries. *BMC Genomics* 2014;15:965.
- (126) Ogata K, Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Sugimura Y, Hibi H, Nakamura S, Ueda M. Evaluation of the therapeutic effects of conditioned media from mesenchymal stem cells in a rat bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like model. *Bone* 2015;74:95-105.
- (127) Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med* 2016;12:5.
- (128) Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, Fujio M, Shohara R, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone* 2014;61:82-90.
- (129) Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010;4:214-22.
- (130) Collino F, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. MicroRNAs and mesenchymal stem cells. *Vitam Horm* 2011;87:291-320.
- (131) Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytherapy* 2016;18:13-24.
- (132) Feng Y, Huang W, Wani M, Yu X, Ashraf M. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. *PLoS One* 2014;9:e88685.
- (133) Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Aguor EN, Timmers L, van Rijen HV, Doevendans PA, Pasterkamp G, Lim SK, de Kleijn DP. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2013;10:301-12.
- (134) Hoy AM, Buck AH. Extracellular small RNAs: what, where, why? *Biochem Soc Trans* 2012;40:886-90.
- (135) Zampetaki A, Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res* 2012;110:508-22.
- (136) Goettsch C, Hutcheson JD, Aikawa E. MicroRNA in cardiovascular calcification: focus on targets and extracellular vesicle delivery mechanisms. *Circ Res* 2013;112:1073-84.
- (137) Robinson HC, Baker AH. How do microRNAs affect vascular smooth muscle cell biology? *Curr Opin Lipidol* 2012;23:405-11.
- (138) Adam WR, O'Brien RC. A justification for less restrictive guidelines on the use of metformin in stable chronic renal failure. *Diabet Med* 2014;31:1032-8.
- (139) Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 1996;30:359-71.
- (140) Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 2011;50:81-98.
- (141) Euvrard S, Morelon E, Rostaing L, Goffin E, Brocard A, Tromme I, Broeders N, del Marmol V, Chatelet V, Domp Martin A, Kessler M, Serra AL, Hofbauer GF, Pouteil-Noble C, Campistol JM, Kanitakis J, Roux AS, Decullier E, Dantal J, Group TS. Sirolimus and secondary skin-cancer prevention in kidney transplantation. *N Engl J Med* 2012;367:329-39.
- (142) Topilsky Y, Hasin T, Raichlin E, Boilson BA, Schirger JA, Pereira NL, Edwards BS, Clavell AL, Rodeheffer RJ, Frantz RP, Maltais S, Park SJ, Daly RC, Lerman A, Kushwaha SS. Sirolimus as primary immunosuppression attenuates allograft vasculopathy with improved late survival and decreased cardiac events after cardiac transplantation. *Circulation* 2012;125:708-20.

- (143) Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;14:1296-302.
- (144) Foster DA, Toschi A. Targeting mTOR with rapamycin: one dose does not fit all. *Cell Cycle* 2009;8:1026-9.
- (145) Miller WG, Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Clark PM, Lindstedt P, Nilsson G, Steffes MW, Group ISW. Toward standardization of insulin immunoassays. *Clin Chem* 2009;55:1011-8.
- (146) Burkewitz K, Zhang Y, Mair WB. AMPK at the nexus of energetics and aging. *Cell Metab* 2014;20:10-25.
- (147) Zhang Q, Yang YJ, Wang H, Dong QT, Wang TJ, Qian HY, Xu H. Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway. *Stem Cells Dev* 2012;21:1321-32.
- (148) de Meester C, Timmermans AD, Balteau M, Ginion A, Roelants V, Noppe G, Porporato PE, Sonveaux P, Viollet B, Sakamoto K, Feron O, Horman S, Vanoverschelde JL, Beauloye C, Bertrand L. Role of AMP-activated protein kinase in regulating hypoxic survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *Cardiovasc Res* 2014;101:20-9.
- (149) Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118:692-702.
- (150) De Meyer GR, Grootaert MO, Michiels CF, Kurdi A, Schrijvers DM, Martinet W. Autophagy in vascular disease. *Circ Res* 2015;116:468-79.
- (151) Grootaert MO, da Costa Martins PA, Bitsch N, Pintelon I, De Meyer GR, Martinet W, Schrijvers DM. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis. *Autophagy* 2015;11:2014-32.
- (152) Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007;3:542-5.
- (153) Ding M, Carrão AC, Wagner RJ, Xie Y, Jin Y, Rzucidlo EM, Yu J, Li W, Tellides G, Hwa J, Aprahamian TR, Martin KA. Vascular smooth muscle cell-derived adiponectin: a paracrine regulator of contractile phenotype. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:474-84.
- (154) Cheang WS, Tian XY, Wong WT, Lau CW, Lee SS, Chen ZY, Yao X, Wang N, Huang Y. Metformin protects endothelial function in diet-induced obese mice by inhibition of endoplasmic reticulum stress through 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase-peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:830-6.
- (155) Anisimov VN. Metformin and rapamycin are master-keys for understanding the relationship between cell senescent, aging and cancer. *Aging (Albany NY)* 2013;5:337-8.
- (156) Breen DM, Giacca A. Effects of insulin on the vasculature. *Curr Vasc Pharmacol* 2011;9:321-32.
- (157) Wang CC, Sorribas V, Sharma G, Levi M, Draznin B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport. *Atherosclerosis* 2007;195:e65-75.
- (158) Harith HH, Di Bartolo BA, Cartland SP, Genner S, Kavurma MM. Insulin promotes VSMC proliferation and apoptosis via differential regulation of TNF-related apoptosis inducing ligand. *J Diabetes* 2015.
- (159) Maiese K. mTOR: Driving apoptosis and autophagy for neurocardiac complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2015;6:217-24.
- (160) Martin KA, Rzucidlo EM, Merenick BL, Fingar DC, Brown DJ, Wagner RJ, Powell RJ. The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C507-17.
- (161) Ding M, Xie Y, Wagner RJ, Jin Y, Carrao AC, Liu LS, Guzman AK, Powell RJ, Hwa J, Rzucidlo EM, Martin KA. Adiponectin induces vascular smooth muscle cell differentiation via repression of mammalian target of rapamycin complex 1 and FoxO4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1403-10.
- (162) Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol* 2016;228:R57-71.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

---

„Ich, Clemens Kurth-Stavenhagen, geb. Kurth, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Das Sekretom mesenchymaler Stromazellen schützt glatte Gefäßmuskelzellen vor Kalzifizierung, was durch Modulation des mTOR-Netzwerkes optimiert werden kann“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

## 8 Lebenslauf

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 9 Danksagung

---

Zunächst möchte ich Duska Dragun für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, ihre Begleitung, ihren Rat und ihre Unterstützung über all die Jahre danken. In ihrer Arbeitsgruppe wurde ich herzlich aufgenommen und von ihrem Team immer freundlich unterstützt. Ganz besonders möchte ich Björn Hegner für die hervorragende Betreuung, viele fruchtbare Diskussionen und die gemeinsame Arbeit danken. Theres Schaub hat mir die Arbeit im Labor nahe gebracht, mich stets mit aufmunternden Worten und Kaffee unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden, dafür vielen Dank. Aus der gemeinsamen Arbeit im Labor sind freundschaftliche Beziehungen entstanden und darüber freue ich mich.

Auch in meinem persönlichen Umfeld habe ich viel Unterstützung erfahren. Ich danke Marie für den Rückhalt durch unsere Freundschaft. Ich danke Paula für den gemeinsamen Weg seit 2008 und die daraus erwachsene Freundschaft. Ein großer Dank gilt meinen Eltern: Ihnen möchte ich für die bedingungslose Unterstützung in all den Jahren danken. Abschließend vielen Dank an Philipp, den ich immer an meiner Seite weiß.